

**Die letzten Schritte der alternativen
Häm-Biosynthese in *Archaea*:
Charakterisierung der Proteine AhbA, AhbB, AhbC
und des Radical SAM Enzyms AhbD aus
*Methanosarcina barkeri***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Melanie Theresia Kühner

aus Öhringen

1. Referentin: Professorin Dr. Gunhild Layer

2. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn

eingereicht am: 15.12.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 18.02.2015

Druckjahr 2015

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kühner, M., Haufschildt, K., Neumann, A., Storbeck, S., Streif, J. & Layer, G.:
The Alternative Route to Heme in the Methanogenic Archaeon *Methanosarcina barkeri*.
Archaea 2014: 327637-327648 (2014).

Tagungsbeiträge

Kühner, M.: The alternative heme biosynthesis in *Archaea* – The Radical SAM Enzyme AhbD. (Vortrag) Bayer PhD Consulting Days 2014, **Leverkusen** (2014).

Kühner, M., Schwietering, M., Neumann, A. & Layer, G.: AhbD - A Radical SAM enzyme involved in the heme biosynthesis pathway in *Methanosarcina barkeri*. (Vortrag) 14th Frankfurt meeting on genome function and gene regulation in *Archaea*, **Schmittgen** (2013).

Kühner, M., Schwietering, M., Neumann, A. & Layer, G.: AhbD - A Radical SAM enzyme involved in the haem biosynthesis pathway in *Methanosarcina barkeri*. (Vortrag) Meeting of the Tetrapyrrole Discussion Group (TPDG), University of Kent, **Canterbury, GB** (2013).

Kühner, M. & Layer, G.: Characterization of the alternative heme synthase Ahb-NirJ1 from *Methanosarcina barkeri*. (Vortrag) Mikrobiologie-Retreat, **Goslar** (2013).

Kühner, M. & Layer, G.: Characterization of the alternative heme synthase Ahb-NirJ1 from *Methanosarcina barkeri*. (Vortrag) Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM) in collaboration with the Royal Netherlands Society for Microbiology (KNVM), **Bremen** (2013).

Kühner, M. & Layer, G.: The alternative heme biosynthesis in *Archaea*. (Vortrag) Tetrapyrrol-Retreat, Technische Universität Braunschweig, **Braunschweig** (2013).

Kühner, M., Schwietering, M., Neumann, A. & Layer, G.: Characterization of Radical SAM enzymes involved in the heme biosynthesis pathway in *Methanosarcina barkeri*. (Poster) Gordon Research Conference (GRC) – Chemistry and Biology of Tetrapyrroles, Salve Regina University, **Newport, RI, USA** (2012).

Kühner, M., Schwietering, M. & Layer, G.: Characterization of Radical SAM enzymes involved in the heme biosynthesis pathway in *Methanosarcina barkeri*. (Poster) Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), **Tübingen** (2012).

Kühner, M., Schwietering, M. & Layer, G.: Radical SAM enzymes involved in the heme biosynthesis pathway in *Methanosarcina barkeri*. (Poster) Mikrobiologie-Retreat, **Warberg** (2012).

“If iron is nature’s favorite essential metal, then heme is its Swiss Army knife: a versatile, indispensable tool which, in the company of its protein sheath, can do seemingly anything.”

Jeffery Mayfield, Carolyn Dehner & J. DuBois (2011)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Tetrapyrrole	1
1.1.1 Coenzym F ₄₃₀ , Häm <i>d</i> ₁ und Sirohäm	2
1.1.2 Häm <i>b</i>	3
1.2 Die klassische Häm-Biosynthese	4
1.2.1 Biosynthese von 5-Aminolävulinsäure	4
1.2.2 Klassische Biosynthese von Häm aus 5-Aminolävulinsäure	5
1.3 Die alternative Häm-Biosynthese	7
1.3.1 Die Geschichte der Entdeckung eines neuen Syntheseweges	7
1.3.2 Alternative Biosynthese von Häm aus 5-Aminolävulinsäure	11
1.3.3 Die späten Biosyntheseschritte in <i>Archaea</i>	13
1.4 Radical SAM Enzyme	15
1.4.1 Eisen-Schwefel-Cluster	16
1.4.2 Reaktionsmechanismus der Radical SAM Enzyme	17
1.5 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	23
2.1.3 Puffer und Lösungen	24
2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	25
2.1.5 Kits, Marker und Standards	26
2.1.6 Kulturmedien	26
2.1.7 Zusatzstoffe	27
2.1.8 Bakterienstämme	27
2.1.9 Plasmide	28
2.1.10 Primer	30
2.1.11 Enzyme	32
2.2 Mikrobiologische Methoden	33

2.2.1	Sterilisation	33
2.2.2	Anaerobe Arbeiten	33
2.2.3	Anlegen von Dauerkulturen	34
2.2.4	Bakterienkultivierung.....	34
2.3	Zell- und Molekularbiologische Methoden	35
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	35
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.3.3	DNA-Reinigung	37
2.3.4	DNA-Konzentrationsbestimmung	38
2.3.5	DNA-Klonierung	38
2.3.6	Herstellung chemokompetenter Zellen und Transformation	40
2.3.7	DNA- Sequenzierung	40
2.4	Proteinbiochemische Methoden	41
2.4.1	Zellaufschluss und Generierung eines zellfreien Extrakts.....	41
2.4.2	Metallionen-Affinitätschromatographie.....	41
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.4.4	Pufferaustausch über eine NAP™-Entsalzungssäule.....	44
2.4.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	44
2.4.6	Proteinkonzentrierung	45
2.4.7	Gelpermeationschromatographie am Äkta™ Purifier	45
2.4.8	Proteinreinigung über Blue Sepharose am Äkta™ Purifier	46
2.4.9	Anionenaustauschchromatographie am Äkta™ Purifier	47
2.4.10	<i>In-vivo</i> -Enzymtest von Ahb-NirD, NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2	48
2.4.11	Rekombinante Proteinproduktion und Reinigung von AhbAB	49
2.4.12	Rekombinante Proteinproduktion und Reinigung von AhbD.....	50
2.4.13	UV/Vis-Spektroskopie	52
2.4.14	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie	53
2.4.15	Eisen- und Schwefel-Konzentrationsbestimmung	54
2.4.16	Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern	56
2.4.17	<i>In-vitro</i> -Enzymtest für AhbAB	57
2.4.18	<i>In-vitro</i> -Enzymtest für AhbD.....	57
2.4.19	<i>S</i> -Adenosylmethionin-Spaltungstest	58
2.4.20	Bindungsstudien von AhbAB mit Häm	58
2.4.21	Bindungsstudien von AhbD mit Substrat und Substratanaloga	59

2.4.22	Kristallisationsansätze von AhbD	59
2.5	Extern durchgeführte Methoden.....	61
2.5.1	Herstellung von Zink-Coproporphyrin III.....	61
2.5.2	HPLC-Massenspektrometrie	61
2.5.3	Elektronenspinresonanz.....	61
2.5.4	Zyklische Voltammetrie	61
2.6	Bioinformatische Methoden.....	62
3	Ergebnisse und Diskussion	63
3.1	<i>In-vivo</i>-Enzymtest von Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2.....	63
3.1.1	Identifizierung der Funktion von Ahb-NirD und Ahb-NirH.....	64
3.1.2	Identifizierung der Funktionen von Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2.....	66
3.2	<i>In-vitro</i>-Charakterisierung von AhbA und AhbB aus <i>M. barkeri</i>	68
3.2.1	Reinigung von AhbA und AhbB	68
3.2.2	Gereinigtes AhbAB enthält ein gebundenes Häm.....	69
3.2.3	<i>In-vitro</i> -Enzymtest für AhbAB.....	72
3.3	<i>In-vitro</i>-Charakterisierung von AhbD aus <i>M. barkeri</i>	77
3.3.1	Anaerobe Reinigung von rekombinantem, nativem AhbD	77
3.3.2	Bestimmung des Fe- und S-Gehalts von nativem AhbD.....	80
3.3.3	<i>In-vitro</i> -Enzymaktivitätstest für natives AhbD	85
3.3.4	Aerobe Reinigung von AhbD mit N-terminalem His-Tag	86
3.3.5	<i>In-vitro</i> -Charakterisierung des AhbD mit His-Tag	89
3.3.6	<i>In-vitro</i> -Enzymtest für AhbD mit His-Tag.....	91
3.4	Charakterisierung der [Fe-S]-Cluster von AhbD	95
3.4.1	Generierung von AhbD-Varianten mit nur je einem [Fe-S]-Cluster.....	95
3.4.2	Aerobe Reinigung der AhbD-[Fe-S]-Varianten mit N-terminalem His-Tag	95
3.4.3	Bestimmung des Fe- und S-Gehalts der AhbD-Varianten nach Rekonstitution	97
3.4.4	ESR-Spektroskopie von AhbD und AhbD-Varianten.....	98
3.4.5	<i>In-vitro</i> -Enzymtest von AhbD und AhbD-Varianten	99
3.4.6	SAM-Spaltungstest von wt AhbD und AhbD-Varianten	101
3.4.7	Elektrochemische Untersuchungen von wt AhbD und AhbD-Varianten.....	103
3.4.8	<i>In-vitro</i> -Enzymtest von wt AhbD und AhbD-Varianten mit Ferredoxin	105
3.4.9	SAM-Spaltungstest von AhbD und AhbD-Varianten mit Ferredoxin	108
3.4.10	Bindungsstudien mit dem Substrat Fe-Copro III.....	109
3.5	Interaktionen von AhbD mit Substratanaloga.....	112

3.5.1	Bindungsstudien mit Copro III, Cu-Copro III und Zn-Copro III.....	112
3.5.2	SAM-Spaltungstests mit Substratanaloga.....	115
3.5.3	<i>In-vitro</i> -Enzymtests mit Substratanaloga.....	116
3.6	Folgestudien zu AhbD C321A/C324A und Cu-Copro III.....	121
3.7	Kristallisation von AhbD	127
3.7.1	Reinigung von AhbD aus <i>M. sedula</i> mit N-terminalem His-Tag	127
3.7.2	Kristallisations-Screens von AhbD aus <i>M. sedula</i> mit Fe-Copro III	131
3.7.3	Strukturelle Vorhersage für AhbD aus <i>M. barkeri</i>	132
4	Zusammenfassung.....	137
5	Summary	139
6	Ausblick.....	141
7	Literaturverzeichnis.....	143
	Anhang	XI
	Danksagung	XV

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchschnitt, durchschnittlich
ϵ	molarer Absorptionskoeffizient (= molarer Extinktionskoeffizient)
~	ungefähr
\triangleq	entspricht
¹ H-NMR	Protonen-Kernspinresonanz
A	Säulen-Auftrag
ad.	auffüllen auf ...(Volumenangabe) mit ...(Substanz)
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
Ahb	<u>a</u> lternative <u>H</u> äm- <u>B</u> iosynthese (früher: <i>archaeal heme biosynthesis</i>)
AhbAB/ <i>ahbAB</i>	neue Nomenklatur der Proteine bzw. Gene Ahb-NirDH/ <i>ahb-nirDH</i>
AhbC/ <i>ahbC</i>	neue Nomenklatur der Proteine bzw. Gene Ahb-NirJ2/ <i>ahb-nirJ2</i>
AhbD/ <i>ahbD</i>	neue Nomenklatur der Proteine bzw. Gene Ahb-NirJ1/ <i>ahb-nirJ1</i>
ALA	5-Aminolävulinsäure
ALAS	5-Aminolävulinsäure-Synthase
Amp	Ampicillin
anSMEcpe	<u>a</u> naerobes <u>S</u> ulfatase- <u>M</u> aturierungsenzym aus <i>Clostridium perfringens</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ara	Arabinose
AS	Aminosäure
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bw	<i>backward</i>
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
Cam	Chloramphenicol
CIP	(<i>alkaline phosphatase, calf intestinal</i>)
co	Codon-optimiert (<i>codon optimized</i>)
CoA	Coenzym A (=HSCoA)
COBALT	<i>constraint-based multiple alignment tool</i>
Copro III	Coproporphyrin III (auch COPRO III)
Copro'gen III	Coproporphyrinogen III
CPO	Coproporphyrinogen III-Oxidase

C-ter	C-terminal
Cu-Copro III	Cu-Coproporphyrin III (auch Cu-COPRO III)
cV	Säulenvolumen = Bettvolumen (<i>column volume</i>)
CV	Zyklische Voltammetrie (<i>cyclic voltammetry</i>)
d	Küvettenlänge
D	Säulen-Durchlauf
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DDSH	12,18-Didecarboxysirohäm
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOA	5'-Desoxyadenosin
DT	(Natrium-) Dithionit
DTT	Dithiothreitol
E	Säulen-Durchlauf nach Elutionsschritt (= Elutionsfraktion)
<i>E</i>	Potential
ESR	Elektronenspinresonanz (= EPR (<i>electron paramagnetic resonance</i>))
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FC	Ferrochelataase
Fd	Ferredoxin
Fe-Copro III	Fe-Coproporphyrin III (auch Fe-COPRO III)
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase
FP	French-Press-Zellaufschluss
fw	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
ggf.	gegebenenfalls
GluTR	Glutamyl-tRNA-Reduktase
GPC	Gelpermeationschromatographie
GSA	Glutaminsäure-1-Semialdehyd
GSAM	Glutaminsäure-1-Semialdehyd-2,1-Aminomutase
H ₂ O _{dd}	bidestilliertes Wasser
His-Tag	PolyHistidin-Sequenz
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IMAC	Metallionen-Affinitätschromatographie (<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>)

inkl.	inklusive
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Bertani, 1951) (Bertani, 1951)
<i>M</i>	Marker
max.	maximal
<i>mbar</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>
MBGD	Microbial Genome Database
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDSH	Monodecarboxysirohäm
mind.	mindestens
<i>Miniprep</i>	Minipräparation (<i>minipreparation</i>)
M_r	relative molekulare Masse
MS	Massenspektrometrie
<i>msed</i>	<i>Metallosphaera sedula</i>
mut.	mutiert
MVI	Monovinyl-Intermediat
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
n	Stoffmenge
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHE	Normal-Wasserstoffelektrode
nI	nach Induktion
Nir	Nitrit Reduktase
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-ter	N-terminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
P	Probe
PAO1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
PB	Probenpuffer
PBG	Porphobilinogen
PBGD	Porphobilinogen-Deaminase
PBGS	Porphobilinogen-Synthase
PCA	Perchloroessigsäure

PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Säulen-Durchlauf nach Prä-Elutionsschritt (= Prä-Elutionsfraktion)
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPO	Protoporphyrinogen IX-Oxidase
Proto IX	Protoporphyrin IX (auch PROTO IX)
Proto'gen IX	Protoporphyrinogen IX
rev	<i>reverse</i>
RS	Radical SAM
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat = Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SH	Sirohäm
Sm	Streptomycin
SUMT	S-Adenosylmethionin-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	(<i>Tris buffered saline</i>)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tm	Schmelztemperatur
TMPD	Tetramethylphenylendiamin
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
Uro'gen III	Uroporphyrinogen III
UROD	Uroporphyrinogen III-Decarboxylase
UROS	Uroporphyrinogen III-Synthase
UV/Vis	<i>ultraviolet/visible</i>
UZ	Ultrazentrifugation
Var.	Variante
vI	vor Induktion

W	Säulen-Durchlauf nach Waschschrift (= Waschfraktion)
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zn-Copro III	Zn-Coproporphyrin III (auch Zn-COPRO III)

Maßeinheiten

°C	Grad Celsius
Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
A	Ampere
AU	<i>absorption units</i>
b	Basen
bp	Basenpaare
Da	Dalton
h	Stunde(n)
L	Liter
m	Meter
M	Molar / Molarität
mol	Mol
min	Minute(n)
M _r	relative molare Masse
Pa	Pascal
psi	<i>pounds per square inch</i> (1 psi = 0,0689 bar)
rpm	<i>rounds per minute</i>
s (= sec)	Sekunden
u	<i>units</i>
V	Volt

Einheitenpräfixe

M	Mega-
K	Kilo-
c	Zenti-
m	Milli-
μ	Mikro-
n	Nano-
p	Pico-

1 Einleitung

1.1 Tetrapyrrole

Tetrapyrrole spielen eine äußerst wichtige Rolle in allen drei Domänen des Lebens. Durch ihr breites Absorptionsspektrum im sichtbaren Wellenlängenbereich werden sie auch oft als *colors of life* – Farben des Lebens bezeichnet. Die beiden bekanntesten Vertreter dieser Stoffklasse sind Chlorophyll, welches als Blattgrün zur Lichtabsorption dient, und der rote Blutfarbstoff Häm, welcher als bekanntestes Beispiel in Verbindung mit dem Protein Globin als Sauerstofftransporter fungiert.

Der Begriff Tetrapyrrol ist die allgemeine Bezeichnung für eine Stoffklasse von Molekülen, welche aus vier Pyrrolringen bestehen, die entweder linear oder makrozyklisch angeordnet sind. Die verschiedenen Tetrapyrrole werden heutzutage mit dem 1-24 Nummerierungsschema nach IUPAC beschrieben, wobei die Kohlenstoff- und die Stickstoffatome des Porphyrin-Grundgerüsts im Uhrzeigersinn durchnummeriert werden (Merritt & Loening, 1980). Auch die einzelnen Pyrrolringe werden ebenfalls im Uhrzeigersinn durch die Buchstaben A-D gekennzeichnet (Abbildung 1.1).

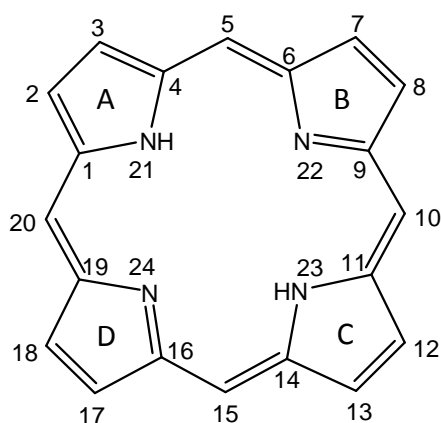


Abbildung 1.1: Grundstruktur einiger zyklischer Tetrapyrrole (1-24 Nummerierungs-Schema). Die Grundstruktur von zyklischen Tetrapyrrolen ist am Beispiel des Porphyrin-Gerüsts dargestellt inklusive der Nummerierung der einzelnen Atome. Bei anderen Grundgerüsten ist die Nummerierung ähnlich, außer bei der Corrin-Struktur, bei der eine Nummerierung der C-Atome nur bis 19 erfolgen kann. (1-20): Nummerierung der C-Atome; (21-24): Nummerierung der N-Atome; (A-D): einzelne Pyrrolringe. (nach Merritt & Loening, 1980).

Das besondere an der Porphyrinstruktur, welche die Grundlage einiger zyklischer Tetrapyrrole wie das bereits genannte Häm darstellt, ist das System aus konjugierten Doppelbindungen, in dem delokalisierte π -Elektronen vorliegen, wodurch eine charakteristische Färbung des Moleküls hervorgerufen wird. Auch ein jeweilig chelatiertes, zweiwertiges Metallion im Zentrum des Grundgerüsts, welches über zwei der vier Stickstoff-

Atome koordiniert wird, ist an der finalen Farbgebung des entsprechenden Tetrapyrrols beteiligt.

Zusammenfassend unterscheiden sich die zyklischen Tetrapyrrole hinsichtlich ihres zentral chelatierten Fe^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} oder Co^{2+} -Metallions, des Oxidationsstatus ihres Ringsystems sowie ihrer daran befindlichen Seitenketten (Heinemann *et al.*, 2008). Zyklische Tetrapyrrole mit vollständig ungesättigtem Ringsystem werden, wie bereits erwähnt, als Porphyrine bezeichnet, worunter die Häme (wie z.B. *a*, *b* und *c*) fallen. Reduziertere Systeme werden als Porphinoide zusammengefasst, wozu Bakteriochlorophylle, Chlorophylle, das Corrinoid Vitamin B₁₂ (ein Cobalamin), Sirohäm, das Isobakteriochlorin Häm *d*₁ und das Coenzym F₄₃₀ gehören (Frankenberg *et al.*, 2003).

1.1.1 Coenzym F₄₃₀, Häm *d*₁ und Sirohäm

Das gelbliche Coenzym F₄₃₀ ist ein Ni(II)-haltiges Tetrapyrrol, welches als prosthetische Gruppe in der Methyl-Coenzym-M-Reduktase zu finden ist (Thauer & Bonacker, 1994). In methanogenen *Archaea* wie *Methanosarcina barkeri* ist diese Reduktase als Schlüsselenzym an der Methanbildung beteiligt.

Die Namensgebung des grünen Fe(II)-haltigen Tetrapyrrols Häm *d*₁ lässt vermuten, dass es zur Gruppe der Häme gehört; es ist jedoch ein Isobakteriochlorin (Chang *et al.*, 1986), welches ausschließlich in der Cytochrom-*cd*₁-Nitritreduktase denitrifizierender Bakterien vorkommt. Diese dissimilatorische Nitritreduktase katalysiert die Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid zur Energiegewinnung unter anaeroben Lebensbedingungen in z.B. *Pseudomonas aeruginosa*. Das Häm *d*₁ ist hierbei im Gegensatz zum ebenfalls präsenten Häm *c* nicht kovalent gebunden (Silvestrini *et al.*, 1994).

Das ebenso Fe(II)-haltige grünliche Isobakteriochlorin Sirohäm ist eine prosthetische Gruppe der assimilatorischen und dissimilatorischen Sulfit- und Nitrit-Reduktasen (Murphy & Siegel, 1973). Assimilatorische Sulfit-Reduktasen reduzieren Sulfit vollständig zu Sulfid wohingegen dissimilatorische Sulfit-Reduktasen, die z.B. in Sulfat-reduzierenden Bakterien wie *Desulfovibrio* Spezies vorkommen, eine unvollständige Reduktion zu Trithionat und Thiosulfat durchführen.

1.1.2 Häm *b*

Häm ist in den meisten Eukaryoten, Bakterien und *Archaea* ein essentielles Molekül, das in vielen Enzymen, Transportern und Rezeptoren zu finden ist. Es fungiert als prosthetische Gruppe in Hämoglobin, Myoglobin, Katalasen, Peroxidasen, Cytochromen P450 und in Sensor-Proteinen für Sauerstoff und Stickstoffmonoxid (Heinemann *et al.*, 2008; Layer *et al.*, 2010).

Häm *b* besitzt als Porphyrin ein vollständig oxidiertes Ringsystem mit einem zentral chelatiertem $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Ion, was zur Planarität des Makrozyklus führt. Neben den vier Methylgruppen an den Positionen C2, C7, C12 und C18 befinden sich zwei Propionatgruppen an den Positionen C13 und C17 sowie zwei Vinylgruppen an den Positionen C3 und C8. Charakteristisch ist, dass die Methyl- sowie die Vinylgruppen asymmetrisch angeordnet sind (Abbildung 1.2).

Neben dem oftmals nur als Häm betitelten Häm *b* existieren andere wichtige Formen wie Häm *c*, welches z. B. in der Cytochrom-*cd*₁-Nitritreduktase vorkommt (1.1.1) und über die Vinylgruppen kovalent an zwei Cysteinreste im Protein gebunden vorliegt.

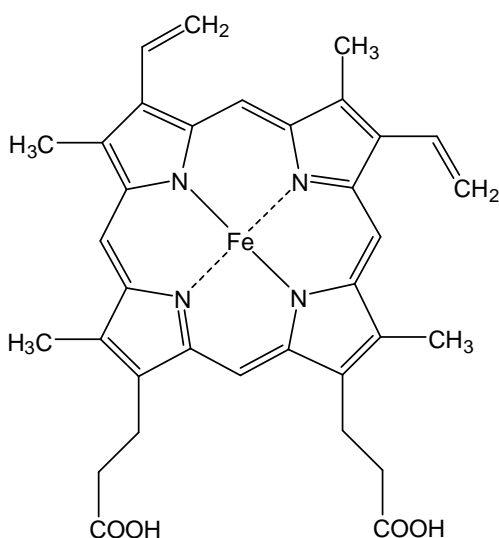


Abbildung 1.2: Struktur des Porphyrins Häm *b*. Charakteristisch sind die Vinylgruppen an den Positionen C3 und C8. Zusätzlich befinden sich am Porphyrin-Grundgerüst Methylgruppen an den Positionen C2, C7, C12 und C18 sowie Propionatgruppen an den Positionen C13 und C17.

1.2 Die klassische Häm-Biosynthese

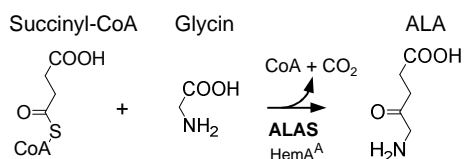
Häm wird in fast allen Eukaryoten und den meisten Bakterien über einen konservierten und gut charakterisierten Biosyntheseweg generiert (Heinemann *et al.*, 2008; Layer *et al.*, 2011).

1.2.1 Biosynthese von 5-Aminolävulinsäure

Als erster Schritt der Häm-Biosynthese wird 5-Aminolävulinsäure (ALA) synthetisiert. In Säugern, Pilzen und α -Proteobakterien geschieht dies über den Shemin-Syntheseweg (Abbildung 1.3 (a)), dessen Existenz 1945 vom Namensgeber David Shemin erstmals postuliert wurde (Shemin & Rittenberg, 1945). In diesem Weg werden Glycin und Succinyl-CoA zu ALA kondensiert (Shemin & Rittenberg, 1946). Dies geschieht durch die 5-Aminolävulinsäure-Synthase (ALAS bzw. Hema^A) unter Bildung von Kohlenstoffdioxid und Coenzym A (CoA) (Ferreira & Zhang, 2002).

In Pflanzen, den meisten Bakterien und *Archaea* wird ALA, sei es zur Häm-Synthese oder zur Synthese von Chlorophyll, über den C₅-Syntheseweg (Abbildung 1.3 (b)) produziert (Beale & Castelfranco, 1973; Beale *et al.*, 1975). Hierbei wird zunächst Glutamyl-tRNA durch die Glutamyl-tRNA-Reduktase (GluTR bzw. Hema^B) unter Abspaltung der tRNA^{Glu} und Verbrauch von NADPH zu Glutaminsäure-1-Semialdehyd (GSA) umgesetzt (Kannangara *et al.*, 1988). Im Anschluss wird GSA durch die GSA-2,1-Aminomutase (GSAM bzw. HemL) zu ALA umgewandelt (Jahn *et al.*, 1992). Der Name C₅-Syntheseweg hat seinen Ursprung in dem aus fünf Kohlenstoffen bestehenden Rückgrat des Substrats Glutaminsäure.

(a) Shemin-Syntheseweg



(b) C₅-Syntheseweg

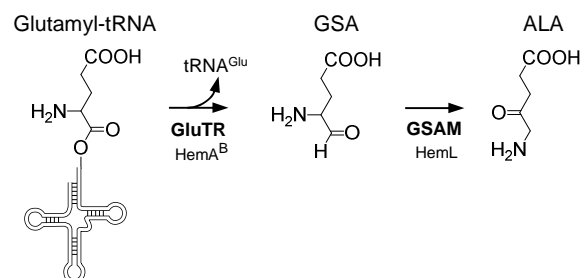


Abbildung 1.3: Wege der ALA-Synthese. (a) Der Shemin-Syntheseweg in Säugern, Pilzen und α -Proteobakterien. (b) Der C₅-Syntheseweg in *Archaea*, Pflanzen und den meisten Bakterien. Die Proteinbezeichnungen sind jeweils unter der entsprechenden Enzymklasse aufgeführt. (verändert nach Layer *et al.*, 2011)

1.2.2 Klassische Biosynthese von Häm aus 5-Aminolävulinsäure

Zwei ALA-Moleküle, ungeachtet dessen, durch welchen Syntheseweg sie entstanden sind (1.2.1), werden zur Generierung von Porphobilinogen (PBG) zunächst durch die PBG-Synthase (PBGS bzw. HemB) kondensiert bevor jeweils vier Moleküle PBG im Anschluss durch die PBG-Deaminase (PBGD bzw. HemC) zu einem linearen Tetrapyrrol oligomerisiert werden (Abbildung 1.4, obere Reihe). Das so entstandene Pre-Uroporphyrinogen wird durch die Verknüpfung der Pyrrolringe A und D unter Invertierung des Pyrrolrings D durch die Uroporphyrinogen-Synthase (UROS bzw. HemD) zu Uroporphyrinogen III (Uro'gen III), dem ersten zyklischen Tetrapyrrol des Syntheseweges (Jordan, 1994), zyklisiert. Uro'gen III ist ein wichtiges Zwischenprodukt des Synthesewegs, da es nicht nur zur Synthese von Häm generiert wird, sondern auch das gemeinsame Vorläufermolekül aller anderen natürlichen Tetrapyrrole darstellt. Durch die Decarboxylierung der vier Acetatgruppen wird Uro'gen III in einem weiteren Schritt durch die Uro'gen-Decarboxylase (UROD bzw. HemE) zu Coproporphyrinogen III (Copro'gen III) modifiziert.

Nach der Bildung von Copro'gen III erfolgen die letzten Syntheseschritte zu Häm (Abbildung 1.4, untere Reihe) (Dailey, 2002). Die Copro'gen III-Oxidase (CPO) katalysiert die Umsetzung von Copro'gen III zu Protoporphyrinogen IX (Proto'gen IX) durch die Bildung von zwei Vinylgruppen aus den Propionatgruppen der Pyrrolringe A und B. Die Umsetzung erfolgt hierbei entweder durch eine Sauerstoff-abhängige CPO (HemF), welche hauptsächlich in Eukaryoten vorherrscht, oder eine Sauerstoff-unabhängige CPO (HemN), die in den meisten Bakterien produziert wird, welche anaerob oder fakultativ anaerob leben (Heinemann *et al.*, 2008). Beide Klassen von CPO stehen in keinem verwandtschaftlichen Verhältnis, da sie keine Homologien zueinander aufweisen. Um eine Verwechslung auszuschließen wird die Sauerstoff-unabhängige CPO auch als Copro'gen III-Dehydrogenase bezeichnet. Das Enzym HemN aus *E. coli* ist eine solche CPO, welche zur Familie der Radical SAM Enzyme gehört (1.4) (Layer *et al.*, 2002). Neben ihr ist auch die Sauerstoff-abhängige CPO HemF in *E. coli* zu finden, da *E. coli* ein fakultativ anaerobes Bakterium darstellt.

Nicht nur die CPO sondern auch die Proto'gen IX-Oxidasen (PPO) liegen entweder als Sauerstoff-abhängiges (HemY) oder Sauerstoff-unabhängiges Enzym (HemG) vor, welche ebenfalls keine Homologien zueinander aufweisen. Die PPO katalysieren die Bildung von Protoporphyrin IX (Proto IX), das direkte Vorläufermolekül von Häm, wobei hierbei formal drei Moleküle Wasserstoff aus der Ringstruktur entfernt werden. Bei diesem Schritt findet eine grundlegende Veränderung des Ringsystemes statt, da aus dem Porphyrinogenring von

Proto'gen IX die Porphyrinring-Struktur des Proto IX generiert wird und dieses farbig erscheint (Abbildung 1.4, untere Reihe). Diese Oxidations-Reaktion kann auch spontan ohne katalysierendes Enzym ablaufen. *E. coli* verwendet jedoch für diesen Schritt die Sauerstoff-unabhängige PPO HemG (Säsärman *et al.*, 1993). Das Auftreten einer dritten PPO, welche durch das Gen *hemJ* codiert wird, wurde durch Genom-Analysen in all jenen Organismen beschrieben, welche weder *hemY* noch *hemG* besitzen (Boynton *et al.*, 2011).

Der letzte Schritt zur Bildung von Häm ist die Insertion eines Fe^{2+} -Metallions in den Porphyrinring durch Ferrochelatasen (FC). Einige eukaryotische FC besitzen ein Eisen-Schwefel-Cluster, dessen genaue Rolle noch unklar ist. Für das Chelatieren von Fe^{2+} muss Proto IX durch die FC leicht gebogen werden, um die Insertion des Eisenions zu ermöglichen. Das Eisenion wird zunächst im aktiven Zentrum gebunden, bevor es sich durch einen Austausch verschiedener Liganden in einer Position oberhalb des Porphyrins befindet (Al-Karadaghi *et al.*, 2006). Dieser so genannte *sitting-atop*-Komplex wird durch schrittweise Deprotonierungen der Stickstoffatome des Porphyrinringes aufgehoben und das Eisen inseriert, wodurch letztendlich Häm (bzw. Häm *b*) entsteht.

Je nachdem, welche Art von Häm gebildet werden soll, wird das Häm *b* z.B. weiter zu Häm *a* oder *c* modifiziert, weshalb Häm *b* auch oft als Protohäm bezeichnet wird.

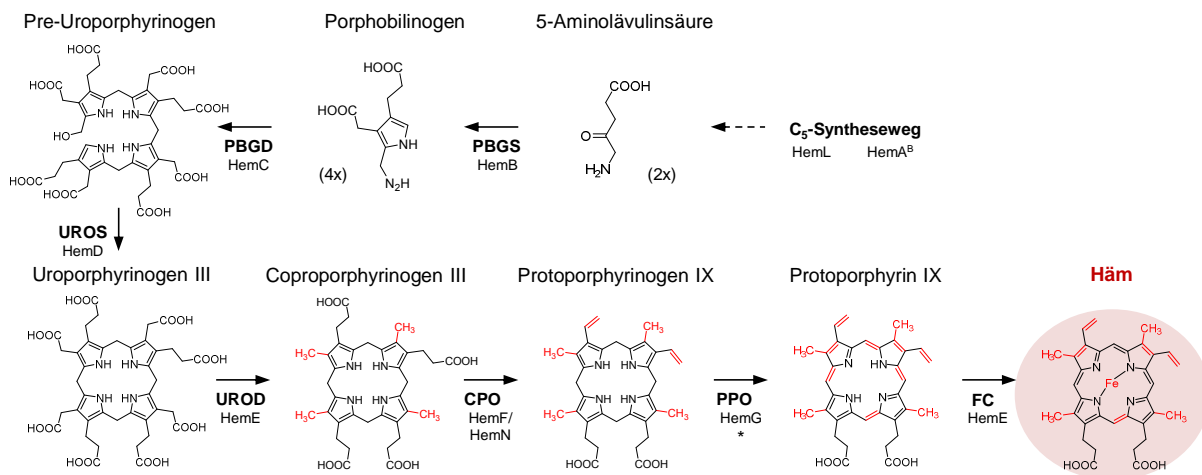


Abbildung 1.4: Weg der klassischen Häm-Biosynthese. Die einzelnen Syntheseschritte von ALA zu Häm in den meisten Bakterien sind mit den Strukturen der jeweilig generierten Moleküle und der Klasse des jeweils katalysierenden Enzyms dargestellt. Die entsprechenden Enzyme aus *E. coli* sind jeweils unter der entsprechenden Enzymklasse aufgeführt. (*): HemY (Sauerstoff-abhängige PPO) oder auch HemJ in anderen Spezies möglich. (verändert nach Layer *et al.*, 2010)

1.3 Die alternative Häm-Biosynthese

1.3.1 Die Geschichte der Entdeckung eines neuen Syntheseweges

Frühe Studien (1993-1998)

Bis in die 1990er Jahre wurde angenommen, dass die Bildung von Häm in allen Organismen nahezu identisch abläuft. Erst durch einen Zufall wurde 1993 die Existenz eines neuen Porphyrin-Biosynthesewegs postuliert (Akutsu *et al.*, 1993).

Während eines Experiments zur genaueren Charakterisierung von Cytochrom c_3 aus dem Sulfat-reduzierenden Bakterium *Desulfovibrio vulgaris* sollten einige Aminosäuren dieses Proteins mit Deuterium markiert werden. Unter den zu untersuchenden Aminosäuren befand sich auch Methionin, welches in markierter Form bereitgestellt wurde und während der Proteinsynthese in das Cytochrom eingebaut werden sollte. Überraschenderweise lag bei der anschließenden Analyse des Cytochroms nicht nur das Protein markiert vor, sondern ebenfalls die als prosthetische Gruppen enthaltenen vier Häm c -Moleküle. Die markierten Methylgruppen konnten durch ^1H -NMR-Spektroskopie an den Positionen C2 und C7 des Tetrapyrrols ausgemacht werden und mussten über das markierte Methionin eingebaut worden sein. Die Parallele zur Cobalamin-Biosynthese, in der die Methylgruppen an diesen Positionen von SAM transferiert werden, sowie ein struktureller Vergleich mit Häm d_1 führte zur Postulierung eines ähnlich verlaufenden Syntheseweges für diese Tetrapyrrole und ließ die Vermutung zu, dass als gemeinsamer Vorläufer Sirohydrochlorin dienen könnte.

Zur Bestätigung dieser Hypothese und zur Identifizierung anderer Intermediate des postulierten alternativen Häm-Biosynthesewegs erfolgten weitere Untersuchungen, darunter erneut solche mit Deuterium markiertem Methionin in *D. vulgaris* (Ishida *et al.*, 1998). In den extrahierten Tetrapyrrolen aus den Bakterien wurden Sirohydrochlorin, Coproporphyrin III, Protoporphyrin IX und ein damals neuartiges Tetrapyrrol identifiziert, welchem man zunächst den Namen Pigment X gab, bevor es sich als 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin herausstellte. Auf Grund der identifizierten Tetrapyrrole, welche nur in ihrer oxidierten Form nachgewiesen werden konnten, wurde ein Biosyntheseweg postuliert, in welchem analog zur Biosynthese des Cobalamins, des Coenzym F_{430} und des Sirohäm Uro'gen III zunächst zu Precorrin-2 (die reduzierte Form des Sirohydrochlorins) methyliert wird, bevor über die Intermediate 12,18-Didecarboxysirohydrochlorin sowie die Intermediate der klassischen Häm-Biosynthese Copro'gen III und Proto'gen IX in einem letzten Schritt Eisen inseriert

werden sollte. Es wurde also zu dieser Zeit angenommen, dass das Eisen wie in der klassischen Häm-Biosynthese erst im letzten Schritt in das Porphyrin eingebaut wird. Dies sollte sich jedoch als falsche Annahme herausstellen.

Genomanalysen (2002-2010)

Genomanalysen bezüglich verschiedener Häm-Biosynthese-Gene unterschiedlicher Organismen verfestigten die Annahme der Existenz eines alternativen Häm-Biosyntheseweges nicht nur auf Grund neu gefundener Intermediate sondern auch durch das Fehlen der Gene für die bisher bekannten späten Enzyme der klassischen Häm-Biosynthese (Panek & O'Brian, 2002). Angeregt durch diesen ersten genomischen Vergleich, bei dem auch ein Fehlen der späten Häm-Biosynthese-Enzyme in *Archaea* deutlich wurde, wurden nun auch erste Versuche mit dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina barkeri* durchgeführt (Abbildung 1.5), in denen ebenfalls markiertes Methionin zum Einsatz kam (Buchenau *et al.*, 2006). Durch das Auffinden von markiertem Häm *b* konnte auch hier die Existenz eines alternativen Syntheseweges postuliert werden, was durch weitere Genom-Analysen bestätigt wurde (Cavallaro *et al.*, 2008).

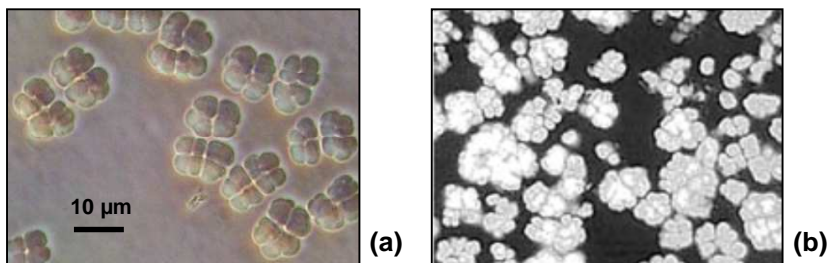


Abbildung 1.5: Der Modellorganismus *Methanosarcina barkeri*.

(a) Zellaggregate von *M. barkeri* DSM 800^T im Phasenkontrast (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). (b) Zellaggregate von *M. barkeri* DSM 804 (bzw. *M. barkeri* Fusaro) im Fluoreszenzmikroskop (Demirel & Scherer, 2008).

In *D. vulgaris* konnten 2009 die frühen Schritte des neuen Häm-Biosyntheseweges durch schrittweise Produktion von Sirohydrochlorin unter Einwirkung der Enzyme CobA/HemD und CysG nachgewiesen werden (Lobo *et al.*, 2009). In dieser Studie wurden auch zum ersten Mal potentiell involvierte Enzyme für die weiteren Syntheseschritte der Häm-Biosynthese in *D. vulgaris* als auch in *Archaea* vorgeschlagen, worunter sich ein Homolog zur CPO HemN befand. Zusätzlich zu diesem Gen (annotiert als *nirJ*) konnte durch ein Vergleich von Genomen auch das als *nirD* annotierte Gen als Kandidat ausgemacht werden. Die Gene innerhalb des *nir*-Operons (*nirSMCFDLGHJEN* in *P. aeruginosa*) waren bislang dafür bekannt, an der Biosynthese des Häm *d*₁ sowie der Häm *d*₁-enthaltenden Cytochrom-*cd*₁-

Nitritreduktase NirS beteiligt zu sein (Rinaldo *et al.*, 2008a). Interessanterweise waren die Schritte zur Synthese der neuen Häm *b*-Intermediate sehr ähnlich zu den Reaktionsschritten, die zur Generierung des Häm *d*₁ ablaufen mussten. Um einiges erstaunlicher war zudem, dass *D. vulgaris* kein Häm *d*₁ synthetisiert.

Im Jahr 2010 konnten durch Genomvergleiche verschiedener *Archaea* ebenfalls Gene detektiert werden, die Homologien zu denen des *nir*-Operons aufweisen (Storbeck *et al.*, 2010). Hierunter zählten zwei homologe Gene zu *nirJ* als auch einfache Homologe zu *nirD* und *nirH*. Diese *nir*-ähnlichen Gene (*ahb-nirJ1*, *ahb-nirD*, *ahb-nirH* und *ahb-nirJ2*) waren neben den frühen Genen der klassischen Häm-Biosynthese (*hemA*, *hemL*, *hemB*, *hemC* und *hemD*) auch häufig in direkter Nähe zu Genen lokalisiert, die für eine potentielle *S*-Adenosylmethionin-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase (SUMT) und für eine potentielle Precorrin-2-Dehydrogenase (PC2-DH) codieren (Abbildung 1.6). Da Proteine, die in einem gemeinsamen Syntheseweg agieren, auch häufig im Genom geclustert vorliegen, verfestigte sich die Annahme, dass diese vier Gene in der alternativen Häm-Biosynthese der *Archaea* involviert sein könnten (Storbeck *et al.*, 2010).

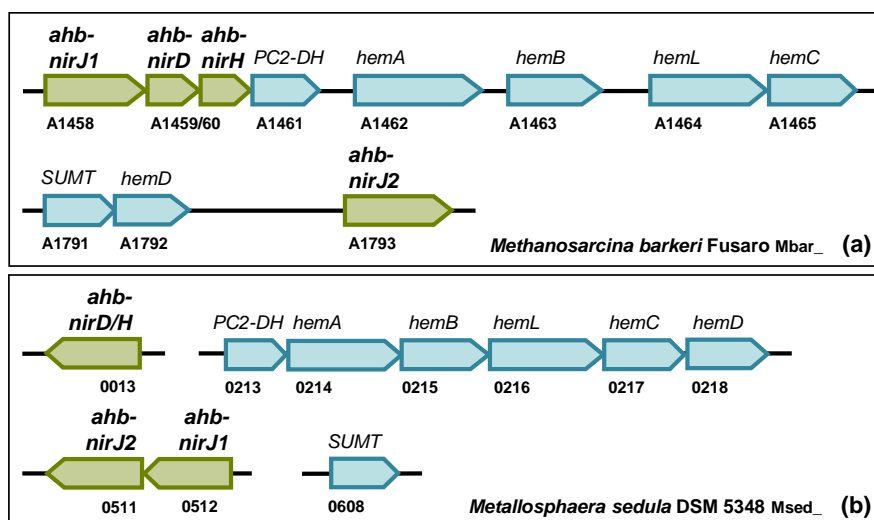


Abbildung 1.6: Gencluster der Häm-Biosynthese-Enzyme in Archaea am Beispiel von *Methanosarcina barkeri* Fusaro und *Metallosphaera sedula*. Angegeben sind die jeweiligen anotierten Gennamen sowie deren Lokus im Genom.

(a) Im Genom von *M. barkeri* sind die bisher uncharakterisierten Gene *Mbar_A1458*, *Mbar_A1459* und *Mbar_A1460* direkt vor dem Häm-Biosynthese-Gencluster lokalisiert, sowie das Gen *Mbar_A1793* direkt nach *hemD* und dem codierenden Gen für eine SUMT. Jedes dieser vier bislang uncharakterisierten Gene weist Homologien zu Genen der Häm *d*₁-Biosynthese auf. Da zwei Gene Homologien zu *nirJ* aus *P. aeruginosa* aufweisen, wurden sie zur Vereinfachung im Bezug auf ihre Lokalisation im Cluster als *ahb-nirJ1* und *ahb-nirJ2* bezeichnet.

(b) Gencluster aus *M. sedula* mit den Genen *Msed_0013* bis *Msed_0608*. Die vier *nir*-ähnlichen Gene liegen nicht mit denen des klassischen Häm-Biosynthesewegs vor. Allerdings ist auffällig, dass das Gen *Msed_0013* eine Genfusion von *ahb-nirD* und *ahb-nirH* darstellt, was einen ersten Aufschluss über die potentielle Funktion bieten könnte. (grüne Pfeile): *nir*-ähnliche Gene in *Archaea*, mit Homologien zu Genen des *nir*-Operons von *P. aeruginosa*; (blaue Pfeile): Gene des klassischen Häm-Biosynthesewegs sowie die bereits charakterisierten Gene des alternativen Synthesewegs in *Archaea*.

In der Tat konnte in *M. barkeri* eine SUMT- sowie eine PC2-DH-Aktivität für die entsprechenden rekombinant produzierten Proteine nachgewiesen werden. Die Charakterisierung der Funktion der *nir*-ähnlichen Gene, welche in *Archaea* zunächst auch als *ahb-nir* Gene auf Grund ihrer potentiellen Involvierung in der archaeellen Häm-Biosynthese (*archaeal heme biosynthesis*) umbenannt wurden, sollte als Ansatz weiterer Forschungsarbeiten dienen.

Aufklärung des alternativen Häm-Biosyntheseweges (2011)

Nur ein Jahr später wurden die letzten Schritte des alternativen Häm-Biosyntheseweges in *D. vulgaris* aufgeklärt (Bali *et al.*, 2011). Anders als 1998 von der Arbeitsgruppe Sano postuliert, enthielten die letzten drei Intermediate dieses Weges bereits ein chelatiertes Eisen. Damit war das Tetrapyrrol Sirohäm, welches selbst auch als prosthetische Gruppe dient (1.1.1) und nicht Sirohydrochlorin das eigentliche Ausgangssubstrat dieses neuen alternativen Häm-Biosyntheseweges (1.3.2). Auf Grund einer ungeeigneten Extraktionsmethode für die Tetrapyrrole im Jahr 1998 und der falschen Annahme, dass alle Intermediate ausnahmslos in der reduzierten Form vorliegen würden, konnten die korrekten Intermediate in *D. vulgaris* also erst über ein Jahrzehnt später ermittelt werden. Die darin involvierten Gene wurden als *ahb* Gene benannt, da sie an der alternativen Häm-Biosynthese (*alternative heme biosynthesis*) beteiligt sind.

1.3.2 Alternative Biosynthese von Häm aus 5-Aminolävulinsäure

Die frühen Biosyntheseschritte zur Bildung von Sirohydrochlorin

In *Archaea* und Sulfat-reduzierenden Bakterien bestehen die ersten Syntheseschritte auf dem Weg zu Häm ebenfalls aus der Bildung von 5-Aminolävulinsäure (ALA), welches in beiden Organismengruppen durch den C₅-Syntheseweg generiert wird (1.2.1). Die weiteren Schritte bis zur Bildung von Uro'gen III werden auch in diesen Organismen durch die Enzyme HemB, HemC und HemD katalysiert (1.2.2). Uro'gen III spielt somit im alternativen als auch im klassischen Häm-Biosyntheseweg eine Schlüsselrolle, da es das letzte gemeinsame Tetrapyrrol beider Wege darstellt.

Durch eine S-Adenosylmethionin-abhängige Uroporphyrinogen III-Methyltransferase (SUMT) wird im alternativen Biosyntheseweg das gebildete Uro'gen III durch einen Methylierungsschritt an den Ringen A- und B an den Positionen C2 und C7 zu Precorrin-2 umgesetzt (Storbeck *et al.*, 2010). Eine Precorrin-2-Dehydrogenase (PC2-DH) oxidiert dieses im Anschluss weiter zu Sirohydrochlorin (Abbildung 1.7, Mitte).

Die späten Biosyntheseschritte in Sulfat-reduzierenden Bakterien

Die Insertion eines Fe²⁺-Ions in das Molekül Sirohydrochlorin durch eine Ferrochelatase (FC), die nicht mit der FC des klassischen Häm-Biosynthesewegs verwandt ist, führt in *D. vulgaris* zur Bildung von Sirohäm. Dieses erste gebildete metallhaltige Tetrapyrrol der alternativen Häm-Biosynthese wird durch die Sirohäm-Decarboxylase AhbAB (einem Homolog zu NirDH) zu 12,18-Didecarboxysirohäm (DDSH) umgesetzt (Bali *et al.*, 2011). Eine oxidative Deacetylierung des DDSH an den Positionen C2 und C7 durch das Enzym AhbC (einem Homolog zu NirJ) resultiert in der Bildung des direkten Häm-Vorläufers Fe-Coproporphyrin III (Fe-Copro III) (Abbildung 1.7, rechts). Häm *b* wird letztendlich durch die Modifizierung der Propionatgruppen des Fe-Copro III an den Positionen C3 und C8 gebildet. Diese Reaktion, bei der Vinylgruppen gebildet werden, wird durch die Fe-Copro III-Oxidase AhbD (einem weiteren Homolog zu NirJ) katalysiert.

Mit der Nomenklatur der Enzyme als AhbA, AhbB, AhbC und AhbD sollte verdeutlicht werden, dass es sich um vier Enzyme der alternativen Häm-Biosynthese handelte (*alternative heme biosynthesis*).

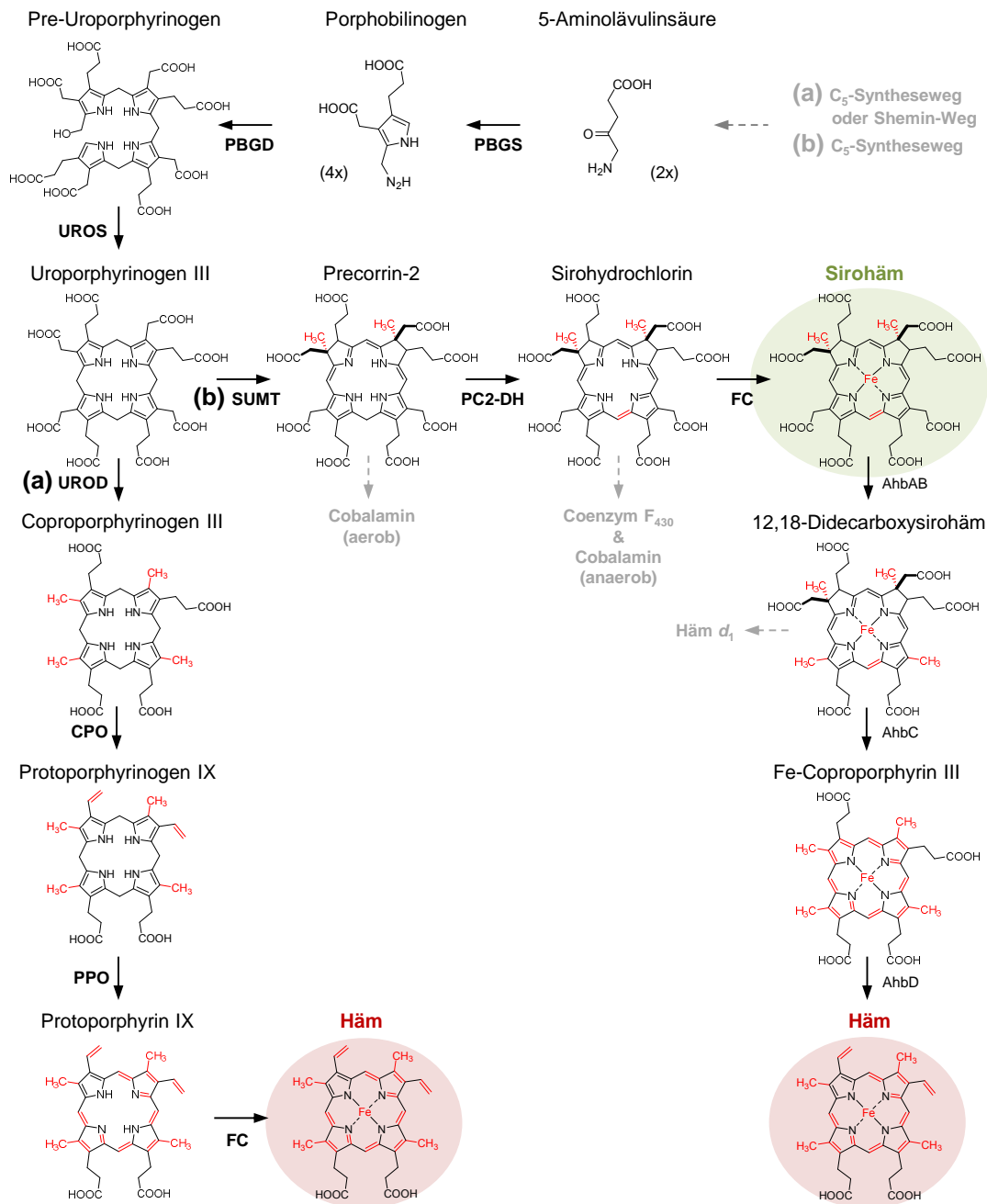


Abbildung 1.7: Vergleich der klassischen mit der alternativen Häm-Biosynthese. Dargestellt sind die Strukturen der Intermediate und die Klasse bzw. der Name des jeweilig katalysierenden Enzyms. (a) Die klassische Häm-Biosynthese in Eukaryoten und den meisten Bakterien. (b) Die alternative Häm-Biosynthese der Sulfat-reduzierenden Bakterien. Synthesewege anderer Tetrapyrrole, welche Parallelen zu denen des alternativen Häm-Biosynthesewegs aufweisen, sind ebenfalls dargestellt.

Gemeinsamkeiten mit anderen Tetrapyrrol-Synthesewegen

Interessanterweise verläuft der alternative Häm-Biosyntheseweg über Intermediate, die ebenfalls als Vorläufer von Cobalamin (Vitamin B12), Coenzym F₄₃₀, Sirohäm sowie Häm d₁ dienen (Abbildung 1.7). Zudem fungiert das Intermediat Sirohäm als eigenständige prosthetische Gruppe der Sulfit- und Nitrit-Reduktasen (1.1.1), sowie das

Fe-Coproporphyrin III als prosthetische Gruppe für (Bakterio-) Ferritin in *D. desulfuricans* (Romão *et al.*, 2000).

Sowohl Häm d_1 als auch Sirohäm sind in evolutionär „alten“ metabolischen Wegen involviert, was sie zu „fossilen“ Hämen macht, die durch ihre Spezifität bis heute dem Evolutionsdruck standhalten konnten (Rinaldo *et al.*, 2008b). Es ist möglich, dass sich aus dem gemeinsamen Syntheseweg dieser alten Häme womöglich der alternative Häm-Biosyntheseweg entwickelte und dass der klassische Weg erst viel später entstanden ist.

1.3.3 Die späten Biosyntheseschritte in *Archaea*

Hypothetische Funktion der Proteine Ahb-NirD und Ahb-NirH

Während der Arbeiten zur Entschlüsselung der alternativen Häm-Biosynthese in *Archaea* wurden die relevanten Enzyme sowie Intermediate im alternativen Häm-Biosyntheseweg in *D. vulgaris* identifiziert (1.3.2). Hierbei wurden die neuen Enzyme AhbA und AhbB charakterisiert, die gemeinsam als Sirohäm-Decarboxylase agieren und auch in der Tat Homologien zu NirDLGH, dem Sirohäm-Decarboxylase-Komplex aus *P. aeruginosa*, aufweisen.

Auch Ahb-NirD und Ahb-NirH aus *M. barkeri* mit Sequenzidentitäten von 45 % und 40 % zu den korrespondierenden Enzymen aus *P. aeruginosa* katalysieren mit großer Wahrscheinlichkeit als heterodimerer Komplex die Umsetzung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm durch die Decarboxylierung der Acetatgruppen am C- und D-Ring des Tetrapyrrols.

Hypothetische Funktionen von Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2

In der alternativen Häm-Biosynthese in *D. vulgaris* konnten die beiden letzten Enzyme charakterisiert werden, die als AhbC und AhbD bezeichnet wurden (Bali *et al.*, 2011). AhbC und AhbD weisen ebenso wie Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 Homologien zu NirJ aus *P. aeruginosa* auf. Eines dieser beiden Enzyme müsste auch in *M. barkeri* und damit in der Domäne der *Archaea* DDSH zu Fe-Copro III oxidieren und das andere dieses Intermediat weiter zu Häm umsetzen. Beiden Enzymen ist gemein, dass sie wie die CPO HemN aus der klassischen Häm-Biosynthese (1.2) ein Cystein-reiches Motiv besitzen, welches charakteristisch für die Bindung eines [4Fe-4S]-Clusters ist. Damit gehören Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 ebenso wie HemN zur Familie der Radical SAM Enzyme (1.4).

Für die Studien an Sulfat-reduzierenden Bakterien konnte AhbC aus *D. vulgaris* nicht rekombinant produziert und gereinigt werden, weshalb eines der beiden NirJ-Homologe aus *M. barkeri* verwendet wurde (Bali *et al.*, 2011). Leider gaben diese Studien keinerlei Aufschluss darüber, welches der beiden Proteine aus *M. barkeri* verwendet wurde und welches somit die Umsetzung von DDSH zu Fe-Copro III bewerkstelligt. Sequenzvergleiche verschiedenster Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 Proteine aus diversen Organismen zeigen, dass die Übergänge fließend sind und anhand von Sequenzhomologien keine Rückschlüsse vorab auf die Funktion getroffen werden kann, da sich beide zu ähnlich sind. Ahb-NirJ1 aus *M. barkeri* weist mit 31 % identischer AS-Sequenz allerdings eine geringere Homologie zu NirJ aus *P. aeruginosa* als Ahb-NirJ2 aus *M. barkeri*, welches zu 42 % identische Aminosäuren aufweist.

1.4 Radical SAM Enzyme

Die Familie der Radical SAM (RS) Enzyme ist eine Superfamilie von Proteinen, welche über einen radikalischen Mechanismus unterschiedlichste Reaktionen katalysieren, darunter ungewöhnliche Methylierungen, Isomerisierungen, Schwefelinsertionen, Ringbildungen, anaerobe Oxidationen und Bildung von Proteinradikalen (Sofia *et al.*, 2001). Die RS Enzyme stellen eine sehr alte Proteingruppe dar, die in allen Domänen des Lebens zu finden ist. In der Pfam-Datenbank, welche sich stets erweitert, wurde diese Proteinfamilie als PF04055 erfasst (Finn *et al.*, 2014). 2008 wurden bereits über 2.800 Proteine ermittelt, die der RS-Familie angehören (Frey *et al.*, 2008). Mittlerweile werden die Mitglieder dieser Proteinfamilie auf fast 50.000 geschätzt (Broderick *et al.*, 2014), was allerdings auch Homologe aus verschiedenen Organismen beinhaltet.

Allen Vertretern der RS-Familie ist gemein, dass sie ein konserviertes Cysteinmotiv (CxxxCxxC) besitzen, welches sich meist am N-Terminus des Proteins befindet. Über dieses Motiv, genauer gesagt über die Schwefelatome der drei Cysteinreste, wird ein Eisen-Schwefel-Cluster koordiniert, welches aus vier Eisen- und vier Schwefelatomen besteht (Abbildung 1.8).

An das vierte, nicht cystein-ligandierte Eisenatom dieses [4Fe-4S]-Clusters kann ein SAM-Molekül gebunden werden (Walsby *et al.*, 2002), welches das essentielle Cosubstrat aller RS-Enzyme darstellt. Das SAM wird zur Generierung eines Radikals homolytisch gespalten. Dieses Radikal initiiert dann viele Reaktionen, die eigentlich energetisch nicht möglich wären (1.4.2).

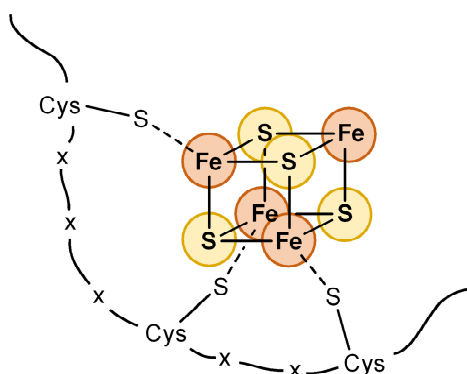


Abbildung 1.8: Charakteristisches Cysteinmotiv der RS-Enzyme zur Koordinierung eines [4Fe-4S]-Clusters. (Cys): Cystein-Rest des RS-Enzyms, (x): Andere variable AS-Reste des RS-Enzyms.

1.4.1 Eisen-Schwefel-Cluster

Eisen-Schwefel-Cluster werden in allen Lebensformen gefunden, wobei sie hauptsächlich als [2Fe-2S]-Cluster oder [4Fe-4S]-Cluster vorliegen (Beinert *et al.*, 1997). Sie besitzen als prosthetische Gruppe unterschiedliche Funktionen innerhalb eines Proteins. [2Fe-2S]-Cluster werden meist zum Transfer eines Elektrons verwendet. Die Funktionen der [4Fe-4S]-Cluster sind diverser (Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2008). So können sie an Redox-Reaktionen beteiligt sein, die Proteinstruktur beeinflussen bzw. stabilisieren, Elektronen transportieren, als katalytisches Zentrum dienen, als Sensor Eisen oder Sauerstoff registrieren und sogar die Genexpression regulieren. Im Fall der RS-Enzyme sind sie auch an Reaktionen beteiligt, bei denen durch Elektronentransfer ein Radikal aus SAM generiert wird (1.4.2).

Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese

Eisen-Schwefel-Cluster werden entweder durch die im *isc*-Operon (*iron-sulfur cluster*), im *nif*-Operon (*nitrogen fixation*) oder im *suf*-Operon (*sulfur mobilization*) codierten Enzyme assembliert (Takahashi & Tokumoto, 2002). Die Nif-Proteine werden zur Maturation der Nitrogenase in Stickstofffixierern verwendet, sind aber auch in einigen Anaerobiern verbreitet, die keine Nitrogenase besitzen (Tian *et al.*, 2014). Das *isc*-Operon ist in Eubakterien und den meisten Eukaryoten vorhanden, während das *suf*-Operon in Bakterien, Pflanzen und Parasiten anzutreffen ist, sowie Teile davon auch in *Archaea* (Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2008). *E. coli* und dessen nahe Verwandte besitzen sowohl das *isc*- als auch das *suf*-Operon, dessen Gene zusätzlich unter Stress- und Fe-Mangelbedingungen exprimiert werden. In allen drei Systemen zur Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung sind mindestens eine Cystein-Desulfurase zur Bereitstellung des Schwefels aus *L*-Cystein und ein Gerüst-Protein (*scaffold*), welches die Assemblierung des Eisen-Schwefel-Clusters erleichtert und vorübergehend bindet, beteiligt.

Eisen-Schwefel-Cluster-Biosynthese in *Archaea*

In den Genomen vieler *Archaea* fehlen Homologe, welche für eine Cystein-Desulfurase codieren. In der Tat konnte in einem methanogenen Archaeon nachgewiesen werden, dass der Schwefel im Cluster nicht aus *L*-Cystein stammt, sondern über einen noch unbekannten Mechanismus inseriert werden muss (Liu *et al.*, 2010). Bisher konnten nur die konservierten Proteine SufB, SufC und ApbC/Nbp35 in *Archaea* nachgewiesen werden, aber vermutlich

sind ebenfalls noch weitere bisher unbekannte Komponenten involviert. Die Biogenese erfolgt wie bisher angenommen in zwei Schritten, der Assemblierung des Clusters und dessen Transport zum Zielprotein (Abbildung 1.9). Im Assemblierungs-Schritt erhält das Gerüst-Protein SufB Schwefel und Eisen von noch unbekannten Donoren und bildet daraus das Cluster. Die ATPase SufC erleichtert die Entlassung des Clusters, sodass es über verschiedene Carrier-Proteine in das Apo-Ziel-Protein inseriert werden kann (Liu *et al.*, 2012).

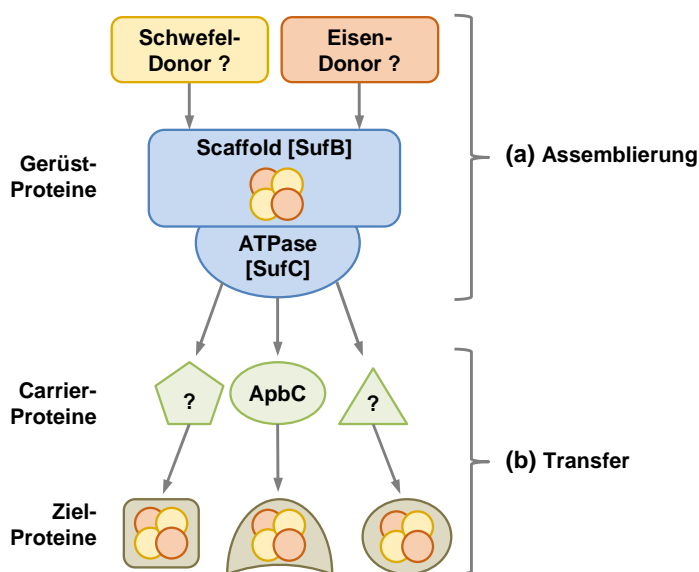


Abbildung 1.9: Modell der [Fe-S]-Cluster Biogenese in *Archaea*. (a) Im Assemblierungs-Schritt wird an Gerüst-Proteinen (SufB) das Cluster gebildet. (b) Im Transfer-Schritt erleichtert die ATPase (SufC) die Entlassung des Clusters, welches zu den Ziel-Proteinen über verschiedene Carrier-Proteine gebracht wird. (?): noch unbekannte Enzyme/Wege. (verändert nach Liu *et al.*, 2012)

1.4.2 Reaktionsmechanismus der Radical SAM Enzyme

Die Eisen-Schwefel-Proteine, die der Radical SAM Familie angehören, verwenden ihr $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster zur Spaltung ihres Cosubstrates SAM, um ein 5'-Deoxadenosyl-Radikal (DOA-Radikal) zu generieren (Abbildung 1.10). Hierbei wird zunächst das Cluster durch zelluläre Redox-Proteine, wie z. B. Flavodoxin in *E. coli*, in den +1-Oxidationszustand überführt (Layer *et al.*, 2004). Die Nähe des über die Amino- und Carboxylgruppe seines Methionin-Anteils gebundenen SAM zum Cluster ermöglicht einen Elektronentransfer auf das Sulfoniumion des SAM. Dieser Elektronentransfer hat die homolytische Spaltung der 5'-C-S Bindung zur Folge, was zur Bildung von Methionin und einem DOA-Radikal führt (Roach, 2011). Dieses Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom vom eigentlichen Substrat um einen radikalischen Mechanismus zu starten.

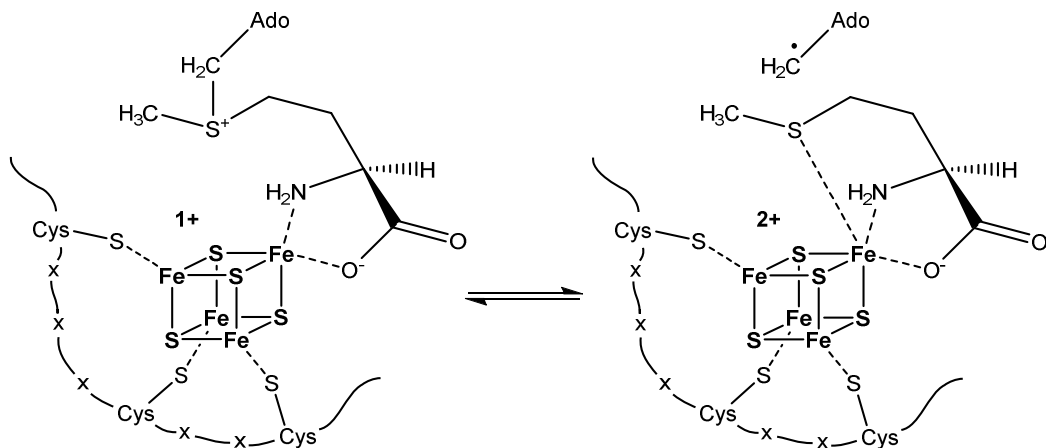


Abbildung 1.10: SAM-Spaltung zur Bildung des 5'-Deoxyadenosylradikals am $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster. SAM wird durch den Transfer eines Elektrons vom reduzierten Cluster in Methionin und ein reaktives DOA-Radikal gespalten. Das SAM kann das unkoordinierte Eisenatom des $[4\text{Fe-4S}]$ -Clusters durch das Stickstoffatom der Amino-Gruppe und das Sauerstoffatom der Carboxyl-Gruppe seines Methionin-Restes koordinieren. (Ado): Adenosyl. (nach Roach, 2011).

Die Reaktionsschritte nach der Abstraktion des Wasserstoffatoms vom Substrat sind für jedes RS-Enzym einzigartig, jedoch können sie je nach Reaktion des Radikals in drei Klassen eingeteilt werden (Booker, 2009).

(I) RS-Enzyme der Klasse I spalten SAM reversibel. Am Ende jedes katalytischen Zyklus reagiert das DOA-Radikal mit noch gebundenem Methionin um SAM zu regenerieren und dabei ein Elektron an das Eisen-Schwefel-Cluster zurückzugeben. (II) RS-Enzyme der Klasse II spalten SAM irreversibel und besitzen als Substrat ein Protein. Das DOA-Radikal abstrahiert hierbei ein Wasserstoffatom eines Glycin-Rests dieses Substrat-Proteins, welches mit dem entstandenen Glycyl-Radikal aktiviert vorliegt. Dann kann die eigentliche Katalyse durch die Abstraktion eines Wasserstoffatoms am Zielsubstrat starten. Das Glycyl-Radikal wird nach jedem Zyklus regeneriert, sodass es nur einmal durch die RS-Aktivase gebildet werden muss. (III) RS-Enzyme der Klasse III spalten SAM irreversibel, welches hierbei ausschließlich die Funktion eines Cosubstrats übernimmt. Für jedes zu abstrahierende Wasserstoffatom des Substrats wird ein SAM-Molekül gespalten, sodass äquimolare Mengen an DOA entstehen. Diese Gruppe ist die vielfältigste von allen dreien, und die Klasse III-Enzyme sind neben den Enzymen der Klasse II in der Lage die Umsetzung von unreaktiven C-H-Bindungen zu katalysieren.

1.5 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die späten Schritte der alternativen Häm-Biosynthese anhand der funktionellen Charakterisierung der beteiligten Enzyme aus Sulfat-reduzierenden Bakterien aufgeklärt. In *Archaea* waren die entsprechend homologen Proteine zwar bioinformatisch identifiziert worden, allerdings wurden diese bislang nicht funktionell charakterisiert.

Daher sollten zunächst die Proteine Mbar_A1458, Mbar_A1459, Mbar_A1460 und Mbar_A1793 (Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2) in verschiedenen Kombinationen mit den Proteinen, welche die ersten Schritte der alternativen Häm-Biosynthese katalysieren, rekombinant in *E. coli* produziert werden, um mittels eines *in-vivo*-Enzymtests ihre vorhergesagten Funktionen zu verifizieren.

Weiterhin sollte die SH-Decarboxylase AhbAB aus *M. barkeri* in *E. coli* produziert und chromatographisch gereinigt werden, um anschließend die Aktivität dieses Enzyms *in vitro* zu testen. Die Rolle des in AhbAB gebundenen Häms sollte untersucht werden.

Des Weiteren sollte die alternative Häm-Synthase AhbD für ihre weitere Charakterisierung zunächst nativ und rekombinant in *E. coli* produziert und anaerob über diverse Chromatographiemethoden gereinigt werden. Da es sich um ein potentiell Eisen-Schwefel-Protein handelt, sollten Eisen- sowie Schwefelgehalt des Proteins bestimmt werden. Der Katalyse-Mechanismus von AhbD sollte durch die Etablierung eines *in-vitro*-Enzymtests genauer charakterisiert werden. Bei erfolgreicher Etablierung der *in-vitro*-Enzymaktivität sollte ein aerobes Produktionssystem für die His-Tag-fusionierte Version der Häm-Synthase generiert werden, um das Protein effizienter zu reinigen. Im Anschluss sollten zur genaueren Untersuchung des Reaktionsmechanismus AhbD-Varianten generiert werden, bei denen spezifische Cysteine durch Alanine ausgetauscht sind, um die Bindung der Eisen-Schwefel-Cluster zu testen. Die Auswirkungen der AS-Austausche sollten durch externe ESR- und CV-Messungen sowie etablierte und modifizierte *in-vitro*-Enzymtests mit Substratanaloga und SAM-Spaltungstests analysiert werden.

Letztlich sollten erste Kristallisationsversuche mit der homologen alternativen Häm-Synthase AhbD aus dem thermophilen Archaeon *Metallosphaera sedula* unternommen werden, um deren Struktur ermitteln zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Anaerobe Werkbänke:

Vinyl Glove Box	Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA
MACS-MG-1000-anaerobic workstation	Don Whitley Scientific Ltd., West Yorkshire, UK

Agarose-Gelelektrophoresekammer:

Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
-------------------	---

Autoklaven:

LVSA 50/70	Zirbus technology GmbH, Bad Grund, D
FVA/A1	Fedegari Autoklaven AG, Bedano, CH

Blot-Apparaturen:

Trans-Blot® Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Electrophoretic Transfer Cell	

Chromatographie:

Äkta™ Purifier UV-900	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
(Säulen : HiTrap™ Blue HP (5mL) ;	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
Mono Q™ 5/50 GL (1mL);	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200pg ;	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
Superdex™ 200 10/300 GL)	GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK

Cryo-Lagerbehälter:

DryShipper QWick 14/24	MVE BioMedical, Ball Ground, GA, USA
------------------------	--------------------------------------

Dokumentation:

Dark Hood DH-50	biostep GmbH, Jahnsdorf, D
DeVision DBox	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern, D

HPLC-Anlage:

JASCO 2000 mit	JASCO® Labor- und Datentechnik GmbH,
MD-2015Plus & FP-2020Plus	Groß-Umstadt, D
(Säulen: Hypercarb ;	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Equisil BDS C18-2;

Reprosil-Pur C18-AQ)

Inkubationsschüttler:

TR-125

HT Aquatron

Lab-Shaker Modell Kühner

Certomat® BS-1

Magnetrührer:

IKA® RCT basic safety control

IKA®-Combimag RCO

Mikrowelle:

LG MS-1922G

pH-Meter:

SevenEasy

Photometer:

NanoDrop® ND-1000

iMark™ Microplate Reader

Ultrospec 2100 pro UV/Visible

Spectrophotometer

V-650 Spectrophotometer

Schüttler:

Vortex-Genie® 2

IKA® KS 130 basic

SDS-PAGE-Kammer:

Mini-PROTEAN® Tetra System

Spannungsgeräte:

PowerPac™ Basic

Thermoblöcke:

Thermomixer compact

ThermoStat plus

Thermocycler:

C1000™ thermal cycler

MyCycler™ thermal cycler

Dr. Maisch Gmbh, Ammerbuch-Entringen, D

Dr. Maisch Gmbh, Ammerbuch-Entringen, D

Infors AG, Bottmingen, CH

Infors AG, Bottmingen, CH

B. Braun, Melsungen, D

Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, D

IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, D

Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D

GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK

JASCO® Labor- und Datentechnik GmbH,

Groß-Umstadt, D

Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Eppendorf AG, Hamburg, D

Eppendorf AG, Hamburg, D

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA

Tiefkühlschrank:

V.I.P.® Series -86°C MDF-U71V SANYO, Wood Dale ,IL, USA

Ultraschallgeräte:

Ultraschall Homogenisator Sonopuls HD 2070 (Sonotrode: KE 76) Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, D

Ultraschallbad eurolab Merck KGaA, Darmstadt, D

Waagen:

Präzisionswaage Talent TE1502S Sartorius AG, Göttingen, D

Analysenwaage Talent TE124S Sartorius AG, Göttingen, D

Vakuumpumpen:

Membranpumpe für Entgasungs-, Anaerobisierungs- und Filtrationsanlage MZ 2C/2.4 Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, D

Vakuumm zentrifugen:

Concentrator plus Eppendorf AG, Hamburg, D

Wasseraufbereiter:

Q-Gard® 2 Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Zellaufschluss-Systeme:

FRENCH® Press (Zelle: 40K) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Disruptor Genie® Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 5415 D Eppendorf AG, Hamburg, D

Tischzentrifuge miniSpin® Eppendorf AG, Hamburg, D

Falconzentrifuge Megafuge 1.0R Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Ultrazentrifuge L-90K (Rotor: Ti 70.1) Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA

Erntezentrifuge Avanti® J-26 XP Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
(Rotor: JLA 8.1)

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von nachfolgenden Firmen bezogen: Fluka® (Buchs, CH), Gerbu Biotechnik (Heidelberg, D), Merck (Darmstadt, D), Qiagen (Hilden, D), Riedel-de Haën® (Seelze, D), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), SERVA (Heidelberg, D), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.1.3 Puffer und Lösungen

Acrylamid-Trenngel (12 %/ 15 %)	12 %/ 15 % Acrylamid; 371 mM Tris (pH 8,8); 0,1 % APS; 0,1 % TEMED
Acrylamid-Sammelgel (6 %)	6 % Acrylamid; 127 mM Tris (pH 6,8); 0,1 % APS; 0,1 % TEMED
AhbAB-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 10 % Glycerin
AhbAB-Prä-Elutions-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 50 mM Imidazol
AhbAB-Elutions-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 300 mM Imidazol
AhbAB-Test-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 5 % Glycerin
AhbCD-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,3 % Triton X-100; 2 mM DTT; 250 mM NaCl
AhbD-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl
AhbD-Wasch-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
AhbD-Elutions-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol
Coomassie-Entfärber	30 % Ethanol; 10 % Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	2,5 % Isopropanol; 10 % Essigsäure; 3,2 % Coomassie Brilliant Blue G250
Krist-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM DTT; 150 mM NaCl
Puffer A	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM DTT
Puffer B	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 5 mM DTT; 2 M NaCl
Puffer C	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM DTT
Puffer D	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM DTT; 1 M NaCl
Puffer CD	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 5 mM DTT; 20 mM NaCl
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS
SDS-Probenpuffer (2x)	100 mM Tris-HCl (pH 6,8); 40 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol; 3,2 % SDS; 0,2 % Bromphenolblau
TAE (50 %)	2 M Tris; 50 mM EDTA (pH 8,0); 1 M Eisessig
TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl
Zelltest-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 2 % Tween 80
Zellwasch-Puffer	0,9 % NaCl; 10 % Glycerin

Alle Puffer und Lösungen wurden mit H₂O_{dd} aufgefüllt und gegebenenfalls auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Anaerobenflaschen:

Afnor-Schraubflaschen mit Zscheile & Klinger GmbH, Hamburg, D
 Clorbutylstopfen (Größen: 1L, 500mL,
 250mL, 125mL)

Dialyse-Systeme:

Slide-A-Lyzer (10kMWCO) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Filter:

Einmalfilter Filtropur S (0.2 ; 0.45) Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
 Filtropur BT50 0.2 500mL Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D

Glasperlen:

Glaskörner, Durchmesser 70-100 µm Kuhmichel Abrasiv GmbH, Ratingen, D
 Glasperlen, Durchmesser 4mm Merck KGaA, Darmstadt, D

Konzentratoren:

Amicon® Ultra – 0.5mL Centrifugal Filters Merck Millipore Ltd., Cork, IRL
 (Ultracel® - 30K; Ultracel® - 10K)
 Rührzelle Amicon® (Modelle: 8010, Merck Millipore Ltd., Cork, IRL
 10mL; Modell 8050, 50mL)
 Vivaspin® 20, 30.000 MWCO Vivaproducts, Inc., Littleton, MA, USA

Küvetten & Platten:

Einmalküvetten 10 x 4x 45mm Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
 Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, D
 SUPRASIL®
 (100-QS 1mm; 105.202QS 10mm)
 Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates Thermo Scientific - Nunc™ A/S, Roskilde, DK

Kristallisations-Platten:

INTELLI-PLATE® 96, 3 well Art Robbins Instruments, Sunnyvale, CA, USA

Loops:

Superloop (10mL; 50mL) GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK

Säulen und Säulenmaterial:

Illustra NAP™-25; Illustra NAP™-5 GE Healthcare Ltd., Buckinghamshire, UK
 Protino® Ni-NTA Agarose MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,
 Düren, D

2.1.5 Kits, Marker und Standards

Kits:

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, D
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
mi-Plasmid Miniprep Kit	Metabion international AG, Planegg, D
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas GmbH, St. Leon Roth, D
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
NeXtal Tubes Cryos Suite	QIAGEN, Hilden, D
NeXtal Tubes JCSG Core I Suite	QIAGEN, Hilden, D
NeXtal Tubes JCSG Core II Suite	QIAGEN, Hilden, D
Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12,000-200,000 Da	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Marker:

GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Unstained Protein MW Marker	Fermentas GmbH, St. Leon Roth, D

Standards:

Fe-Standard für AAS TraceCERT®	Fluka®, Buchs, CH
Hemin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Protoporphyrin III;	Frontier Scientific Services Inc., Newark, DE, USA
Coproporphyrin III;	
Fe-Coproporphyrin III;	
Cu-Coproporphyrin III	

2.1.6 Kulturmedien

LB-Flüssigmedium

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
Trypton	1 %	10g
Hefeextrakt	0,5 %	5g
NaCl	1 %	10g

→ ad. 1 Liter H₂O_{dd}

LB-Agarlösung

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
LB-Flüssigmedium	-	1 Liter
Agar	1,5 %	15g

Sowohl das Flüssigmedium als auch die Agarlösung wurden nach dem Autoklavieren abgekühlt und dann gegebenenfalls mit Zusatzstoffen (2.1.7) versehen. Vor dem Festwerden der Agarlösung wurden die Platten gegossen.

2.1.7 Zusatzstoffe

Substanz:	Endkonzentration:	Stocklösungen:
Ampicillin	100 µg/mL	100 mg/mL in H ₂ O _{dd}
Arabinose (L+)	0,2 %	20 % in H ₂ O _{dd}
Chloramphenicol	34 µg/mL	34 mg/mL in Ethanol
IPTG	500 µM	500 mM in H ₂ O _{dd}
NaNO ₃	20 mM	1 M in H ₂ O _{dd}
Streptomycin	20 µg/mL	20 mg/mL in H ₂ O _{dd}

Kulturmedien, denen Zusatzstoffe beigemischt wurden, waren bei 4 °C gelagert und wurden innerhalb einer kurzen Zeitspanne verwendet.

2.1.8 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH10B	F <i>araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> <i>galU galK rpsL deoR</i> Φ80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> <i>endA1 nupG recA1 mcrA</i> Δ(<i>mrr hsdRMS</i> <i>mcrBC</i>) mit Sm ^R	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <i>dcm ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)	(Studier & Moffatt, 1986)

2.1.9 Plasmide

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pACYC_ <i>nirDLGH</i>	<i>nirDLGH</i> (PAO1); His-Tag, N-ter; cam^R	Sonja Storbeck Doktorarbeit, 2011
pMA_ <i>nirJ1</i>	<i>ahb-nirJ1</i> (<i>mbar</i>), Codon-optimiert für <i>E. coli</i> (<i>SacI/KpnI</i>); amp^R	Life Technologies™ - invitrogen™ - GeneArt®
pMA_ <i>nirJ2</i>	<i>ahb-nirJ2</i> (<i>mbar</i>), Codon-optimiert für <i>E. coli</i> (<i>SacI/KpnI</i>); amp^R	Life Technologies™ - invitrogen™ - GeneArt®
pMA-T <i>msed_0512 nirJ1</i>	<i>ahb-nirJ1</i> (<i>msed</i>), Codon-optimiert für <i>E. coli</i> (<i>NdeI/XhoI</i>); amp^R	Life Technologies™ - invitrogen™ - GeneArt®
pETDuet-1	Leervektor; amp^R	Merck KGaA - Novagen®
pBCM_ <i>cysG6</i>	<i>cysG</i> (<i>Salmonella typhimurium</i>); cam^R	(Schnell <i>et al.</i> , 2005)
pETDuet <i>nirDLGHJEN</i>	<i>nirDLGHJEN</i> (PAO1); amp^R	Johannes Walther
pET22b <i>nirDHJ1J2</i> ≡ pET22b <i>ahbABCD</i>	<i>ahb-nirD/ ahh-nirH/ ahh-nirJ1/</i> <i>ahb-nirJ2</i> (<i>mbar</i>); His-Tag, C-ter; <i>EcoRI/link/lock</i> (<i>XbaI/SpeI</i>) <i>ahb-</i> <i>nirD</i> ; (<i>BamHI/HindIII</i>) <i>ahb- nirJ2</i> ; <i>link/lock</i> (<i>XbaI/SpeI</i>) <i>ahb-nirH</i> , <i>ahb-nirJ1</i> ; amp^R	Judith Streif (Kühner <i>et al.</i> , 2014)
pET22b <i>nirDHJ1_{t78a} J2</i> ≡ pET22b <i>ahbABCD_{t78a}</i>	<i>ahb-nirD/ ahh-nirH/ ahh-nirJ1_{t87a} /</i> <i>ahb-nirJ2</i> (<i>mbar</i>), His-Tag, C-ter, <i>link/lock</i> s.o.; amp^R	diese Arbeit & (Kühner <i>et al.</i> , 2014)
pET22b <i>nirDHJ1_{a76t} J2</i> ≡ pET22b <i>ahbABC_{a76t}D</i>	<i>ahb-nirD/ ahh-nirH/ ahh-nirJ1/</i> <i>ahb-nirJ2_{a76t}</i> (<i>mbar</i>), His-Tag, C-ter, <i>link/lock</i> s.o.; amp^R	diese Arbeit & (Kühner <i>et al.</i> , 2014)
pETDuet <i>nirDH</i> ≡ pETDuet <i>ahbAB</i>	<i>ahbA/ ahhB</i> (<i>mbar</i>); His-Tag, N-ter; amp^R	Sonja Storbeck (Kühner <i>et al.</i> , 2014)
pETDuet_1_ <i>nirJ1_mbar</i> ≡ pETDuet <i>ahbD/HIS</i>	<i>ahbD</i> (<i>mbar</i>) co in 1.MCS, His-Tag, N-ter, (<i>BamHI/ HindIII</i>); amp^R	diese Arbeit

pETDuet_2_nirJ1_mbar ≡ pETDuetahbD	ahbD (mbar) co in 2.MCS, (MfeI/ XhoI); amp ^R	diese Arbeit & (Kühner <i>et al.</i> , 2014)
pETDuet_1_nirJ1_msed	ahbD (msed) co in 1.MCS, His- Tag, N-ter (EcoRI/HindIII); amp ^R	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_N_mbar ≡ pETDuetahbDp.C19,23A/HIS	ahbD p.C19,23A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C_mbar ≡ pETDuetahbDp.C321,324A/HIS	ahbD p.C321,324A (mbar)*	diese Arbeit

* in 1.MCS, His-Tag, N-ter (BamHI/ HindIII) (250bp von pJET1.2 blunt nach Stopp-Codon); amp^R

Zusätzlich generierte Plasmide für weitere Arbeiten

Plasmid	Eigenschaft	Referenz
pACYCDuet_1_nirJ1_mbar	ahbD (mbar) co. in 1.MCS, His-Tag, N-ter (BamHI/HindIII); cam ^R	diese Arbeit
pACYCDuet_2_nirJ1_mbar	ahbD (mbar) co. in 2.MCS, (MfeI/XhoI); cam ^R	diese Arbeit
pET-52b_nirJ1_mbar	ahbD (mbar) co, His-Tag, C-ter; Strep-Tag II, N-ter, (BamHI/NotI); amp ^R	diese Arbeit
pETDuet_2_nirJ1_msed	ahbD (msed) co in 2.MCS, (NdeI/XhoI); amp ^R	diese Arbeit
pACYCDuet_1_nirJ1_msed	ahbD (msed) co in 1.MCS, His-Tag, N-ter (EcoRI/HindIII); cam ^R	diese Arbeit
pACYCDuet_2_nirJ1_msed	ahbD (msed) co in 2.MCS, (NdeI/XhoI); cam ^R	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C1_mbar	ahbD p.C312A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C2_mbar	ahbD p.C315A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C3_mbar	ahbD p.C321A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C4_mbar	ahbD p.C324A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_C5_mbar	ahbD p.C342A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_NC1_mbar	ahbD p.C19,23A (mbar)* ahbD p.C312A (mbar)*	diese Arbeit
pETDuet_1_nirJ1_NC2_mbar	ahbD p.C19,23A (mbar)*	diese Arbeit

	<i>ahbD</i> p.C315A (<i>mbar</i>)*	
pETDuet_1_ <i>nirJ1_NC3_mbar</i>	<i>ahbD</i> p.C19,23A (<i>mbar</i>)*	diese Arbeit
	<i>ahbD</i> p.C321A (<i>mbar</i>)*	
pETDuet_1_ <i>nirJ1_NC4_mbar</i>	<i>ahbD</i> p.C19,23A (<i>mbar</i>)*	diese Arbeit
	<i>ahbD</i> p.C324A (<i>mbar</i>)*	
pETDuet_1_ <i>nirJ1_NC5_mbar</i>	<i>ahbD</i> p.C19,23A (<i>mbar</i>)*	diese Arbeit
	<i>ahbD</i> p.C342A (<i>mbar</i>)*	
pETDuet_1_ <i>nirJ1_NC_mbar</i>	<i>ahbD</i> p.C19,23A (<i>mbar</i>)*	diese Arbeit
	<i>ahbD</i> p.C321,324A (<i>mbar</i>)*	

* in 1.MCS, His-Tag, N-ter (*Bam*HI/ *Hind*III) (250bp von pJET1.2 blunt nach Stopp-Codon); amp^R

2.1.10 Primer

Die Konzentration der Stocklösung aller Primer beträgt 100 pmol/μL, die der Arbeitslösung 10 pmol/μL. Die T_m wurde vom Hersteller Metabion international AG, Planegg, D. ermittelt.

Klonierungs-Primer

Oligo	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
fw <i>nirJ1_MunI mbar</i>	CTCAATTGGATTGCCATGACCAATG	64,0
rev <i>nirJ1_XhoI mbar</i>	GATCCGATCGCTCGAGTTTATTTTTTAC	66,0
fw <i>nirJ2_MunI mbar</i>	CTCAATTGGATTGGCATCAGCAAAC	64,0
rev <i>nirJ2_XhoI mbar</i>	GCACTCGAGCTTTTAGGCTTCGTAATAG	69,0
① NirJ1_Duet_ <i>Bam</i> HI_fw ≡ NirJ1_pET52b_ <i>Bam</i> HI_fw	GGATCCGATGATTGCCATGACC	57,0
② NirJ1_Duet_ <i>Hind</i> III_bw	GAAGCTTTTATTTTTTACCCGGACGGT	57,0
③ NirJ1_Duet_ <i>Mfe</i> I_fw	CAATTGGATGATTGCCATGACCAATG	56,0
④ NirJ1_Duet_ <i>Xho</i> I_bw	GCTCGAGTTATTTTTTACCCGGAC	56,0
⑤ NirJ1_pET52b_ <i>Not</i> I_bw	GCGGCCGCTTTTTTTTACCCG	57,0

Primer zur Amplifizierung von *nirJ1* bzw. *nirJ2* von *M. barkeri* aus pMA_*nirJ1* bzw. pMA_*nirJ2*.

Da bei der Klonierung von *ahb-nirJ1* aus *M. barkeri* die Überhänge der verwendeten Klonierungs-Primer zu gering waren für einen direkten Verdau der Amplifikate, wurde nach der PCR eine Zwischenklonierung in den Vektor pJET1.2 blunt durchgeführt. *ahb-nirJ1* aus *M. sedula* konnte direkt aus dem Vektor pMA-T *msed_0512 nirJ1* verdaut werden.

Mutagenese-Primer für QuikChange Kit

Oligo	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
<i>nirJ1</i> Stop	CTGAATTGTGTTTCATTGACGTGGTGCAAGCACCAG	75,0
<i>nirJ1</i> Stop antisense	CTGGTGCTTGCACCACGTCAATGAACACAATTCAG	75,0
<i>nirJ2</i> Stop	GGTCGTGATAGCAAATAACTGCCGAGCCATCTG	75,0
<i>nirJ2</i> Stop antisense	CAGATGGCTCGGCAGTTATTTGCTATCACGACC	75,0
NirJ1 p.C312A	CCGGAAGAACTGAAAGGTAAAGCTGGCATCTGCGAG	78,0
NirJ1 p.C312A_anti	CTCGCAGATGCCAGCTTTACCTTTCAGTTCTTCCGG	78,0
NirJ1 p.C315A	GGTAAATGTGGCATCGCCGAGTATAAAAAAGTTTGT GCAGG	77,0
NirJ1 p.C315A_anti	CCTGCACAACTTTTTTATACTCGGCGATGCCACATT TACC	77,0

Primer zur Generierung von pET22*bnirABDC* Stopp-Varianten sowie Primer zur Generierung von diversen pETDuet*ahbD*/HIS Cysteinmutanten.

Mutagenese-Primer für Q5 Kit

Oligo	Sequenz (5' - 3')	T _m (°C)
nebC3_NirJ1	TAAAAAAGTTGCTGCAGGTTGTCGTGCACGTG	60,0 (63,0)
nebC3_NirJ1_anti	TACTCGCAGATGCCACATTTAC	64,0 (63,0)
nebC4_NirJ1	TTGTGCAGGTGCTCGTGCACGTG	55,0 (58,0)
nebC4_NirJ1_anti	ACTTTTTTATACTCGCAGATG	56,0 (58,0)
nebC_NirJ1	GGTGCTCGTGCACGTGCATATGC	64,0 (63,0)
nebC_NirJ1_anti	TGCAGCAACTTTTTTATACTCGCAGATGC	60,0 (63,0)
nebN_NirJ1	CATGCTCGTGGTGCAAGCACCAG	66,0 (66,0)
nebN_NirJ1_anti	AACAGCATTCAGATTACAACCTGCGGTC	63,0 (66,0)
nebC5_NirJ1	AGAACCGTATGCTATTTACCGTCCGGG	55,0 (58,0)
nebC5_NirJ1_anti	TCTTCCAGATAATCACCG	55,0 (58,0)

Primer zur Generierung von diversen pETDuet*ahbD*/HIS Cysteinmutanten

(): berechnete Annealing Temperatur nach Hersteller des Kits New England Biolabs für beide Primerpaare.

Sequenzier-Primer

Oligo	Sequenz (5' - 3')	Tm (°C)
DuetUP2	TTGTACACGGCCGCATAATC	58,0
T7 term spezi	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAG	58,9
Mbar_NirJ1_us_fo	GCAACCGGTATTCGTGATTATACC	64,0
Mbar_NirJ1_ds_re	GCAGTGCATCACTCGGTTC	59,0
Mbar_NirJ2_us_fo	GGTGATTATCTGGAAGAAGAACC	61,0
PrimerACYCDuetUP1	GGATCTCGACGCTCTCCCT	62,0
DuetDOWN1	GATTATGCGGCCGTGTACAA	58,0
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	54,0
pET Upstream (=DuetUpstream)	GATGCGTCCGGCGTAGAGG	64,0

Primer zur Sequenzierung durch GATC Biotech AG, Konstanz, D.

2.1.11 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Alkaline Phosphatase, calf intestinal (CIP)	New England Biolabs
Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase (FNR) aus <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma-Aldrich
Ferredoxin (Fd) aus <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich

Die Konzentration der *Taq*-Polymerase beträgt 5 u/μL, die der Phusion-Polymerase 2 u/μL und die der CIP 1 u/μL. FNR und Fd wurden lyophilisiert bezogen. BSA lag in einer Konzentration von 2 mg/mL vor.

Enzym	Erkennungssequenz (5' - 3')	Hersteller
<i>Bam</i> HI-HF®	G ↓ G A T C C	New England Biolabs
<i>Hind</i> III-HF®	A ↓ A G C T T	New England Biolabs
<i>Mfe</i> I-HF®	C ↓ A A T T G	New England Biolabs
<i>Nde</i> I	C A ↓ T A T G	New England Biolabs
<i>Not</i> I-HF®	G C ↓ G G C C G C	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	C ↓ T C G A G	New England Biolabs

Die Konzentration der Restriktionsendonukleasen beträgt 10 u/μL. Da ausschließlich mit zwei Enzymen verdaut wurde, wurde der Puffer je nach Anwendung und Kombination der Enzyme nach Herstellerangaben ausgewählt.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation

Alle eingesetzten Materialien, Lösungen und Medien wurden bei 121 °C für 20 min bei 2 bar dampfsterilisiert. Verwendete Mikroorganismen wurden nach Versuchsende auf die gleiche Weise zur Abtötung autoklaviert. Medienzusätze, welche durch ihre Hitzeinstabilität nicht autoklaviert werden konnten, wurden mittels Membranfilter der Porengröße 0,2 µM sterilfiltriert.

2.2.2 Anaerobe Arbeiten

Anaerobe Arbeiten wurden entweder in einer Vinyl Glove Box von Coy (Grass Lake, MI, USA) oder in einer MACS-MG-1000 anaeroben Arbeitsstation von Don Whitley (West Yorkshire, UK) mit anaeroben Materialien, Lösungen und Medien durchgeführt. Neben kleineren Geräten befanden sich Segmente eines Äkta™ Purifiers UV-900 von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) und eine Messapparatur des V-650 Spektrophotometers von JASCO® (Groß-Umstadt, D) auf den anaeroben Werkbänken in anaerober Atmosphäre.

Die Anaerobisierung von Puffern erfolgte unter kontinuierlichem Rühren in Afnor-Schraubflaschen, welche an eine Anaerobisierungsanlage angeschlossen wurden. Die Membranpumpe der Anlage zog entsprechend der zu anaerobisierenden Puffermenge in regelmäßigen Zyklen Vakuum und begaste im Anschluss die Flüssigkeit mit Stickstoff.

Puffermenge:	Zyklusintervall:	Zeit:
100 mL	1 min	2 h
500 mL	2 min	3 h
1 L	2 min	4 h

Anaerobe Proteine und Zellpellets wurden in Anaerobenflaschen, welche mit Clorbutylsepten verschlossen wurden, überführt und bei 4°C gelagert. Wurden Proteine zunächst aerob gereinigt oder Pulver anaerobisiert, erfolgte eine Inkubation entsprechend des zu anaerobisierenden Volumens innerhalb der anaeroben Werkbänke.

2.2.3 Anlegen von Dauerkulturen

Zum Anlegen einer Dauerkultur wurden 400 µL einer sterilen 80 % Glycerin-Lösung mit 800 µL einer Übernachtskultur versehen. Die Substanzen wurden gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen, die eine Endkonzentration an Glycerin von 26,7 % besaßen, direkt bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung von Bakterienstämmen erfolgte unter aseptischen Bedingungen unter der Zugabe entsprechender Zusatzstoffe (2.1.7).

Zur Generierung einer flüssigen Bakterienkultur von 6 mL bis 100 mL Endvolumen wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte oder von einer Glycerin-Dauerkultur in ein entsprechendes LB-Flüssigmedium inokuliert und bei 37 °C bei 200 rpm üN im Dunkeln inkubiert. Für Hauptkulturen mit einem größeren Endvolumen wurde im Verhältnis 1:100 mit einer Übernachtskultur inokuliert. Die Bestimmung der Zelldichte einer flüssigen Bakterienkultur wurde durch Messung der OD bei einer Wellenlänge von 578 nm oder 600 nm bestimmt.

Eine anaerobe Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter der zusätzlichen Zugabe von Natriumnitrat (NaNO_3) in Anaerobenflaschen, welche mit Clorbutylsepten verschlossen und bei 100-150 rpm inkubiert wurden.

Zur Kultivierung von Bakterienstämmen auf LB-Agar-Platten wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher ausgestrichen oder eine Suspension von 50-100 µL durch sterile Glasperlen ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C üN im Dunkeln.

2.3 Zell- und Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) wurde durchgeführt um DNA-Sequenzen durch den Einsatz spezifischer Primer *in vitro* zu amplifizieren und ggf. gleichzeitig Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen einzufügen, um bei einer Mutagenese-Reaktion gezielt Desoxyribonukleotide (dNTP) auszutauschen oder um auf den Einbau eines Inserts nach der Klonierung zu testen.

Das PCR-Programm wurde abhängig von der Anwendung, der Größe des Amplifikats sowie der eingesetzten Primer-Schmelztemperatur (T_m) angepasst.

Amplifizierung von DNA-Sequenzen

• Reaktionsansatz:

5x Phusion Buffer	10 μ L
10 mM dNTP	1 μ L
fw Primer (10 pmol/ μ L)	2 μ L
rev Primer (10 pmol/ μ L)	2 μ L
Template-DNA	6 μ L
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (2 u/ μ L)	0,5 μ L
H ₂ O _{dd}	28,5 μ L
	<hr/>
	50 μ L

• PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	98 °C	2 min	
Denaturierung	98 °C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	*	30 s	
Elongation	72 °C	*	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
Kühlung	4 °C	∞	

* Die Annealing-Temperatur ist abhängig vom jeweiligen Primer-Paar, die Elongationszeit hingegen von der Größe des PCR-Fragments und der Extensionsrate der Polymerase (Phusion: 30 s/kb).

Nach der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz ggf. auf ein Agarosegel geladen und das Amplifikat aus dem selbigen isoliert (2.3.3).

Kolonie-PCR zum Test auf Einbau eines Inserts• Reaktionsansatz:

10x Buffer <i>Taq</i> Standard	2 μ L
10 mM dNTP	0,4 μ L
fw Primer (10 pmol/ μ L)	0,4 μ L
rev Primer (10 pmol/ μ L)	0,4 μ L
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 u/ μ L)	0,1 μ L
50 mM MgCl ₂	0,6 μ L
H ₂ O _{dd}	16,1 μ L
	<hr/>
	20 μ L

Eine zu testende Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenpitze aufgenommen, auf eine LB-Agar-Platte überstrichen und anschließend im Reaktionsansatz resuspendiert. Die Pipettenspitze wurde ggf. direkt zur Inokulierung eines LB-Flüssigmediums verwendet.

• PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	*	30 s	
Elongation	72 °C	*	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Kühlung	12 °C	∞	

* Die Annealing-Temperatur ist abhängig vom jeweiligen Primer-Paar, die Elongationszeit hingegen von der Größe des PCR-Fragments und der Extensionsrate der Polymerase (Taq: 60s/kb).

Nach der PCR wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein Agarosegel geladen und das Amplifikat analysiert.

Mutagenese von DNA-Sequenzen

Bei der Verwendung der Mutagenesekits Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) und QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent (Santa Clara, CA, USA) wurde die PCR nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde angewandt um DNA-Fragmente anhand ihrer molekularen Größe zu analysieren. Die entsprechenden Proben wurde im Verhältnis 5:1 in 6x Loading-Dye von Fermentas (St. Leon Roth, D) aufgenommen und auf ein 0,7-1 %iges Agarose-Gel in TAE-Puffer aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 90-110V für 30-45 min. Zur Detektion der DNA-Banden wurde das Agarose-Gel für 15 min in einer 0,1 %ige (v/v) Ethidiumbromidlösung inkubiert. Das Ethidiumbromid interkalierte mit der vorhandenen DNA, welche somit durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht werden konnte.

50x TAE-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
Tris	2M	242g
0,5M EDTA (pH 8,0)	50mM	100ml
Eisessig	1M	57,1ml

→ ad. 1 Liter H₂O_{dd}

2.3.3 DNA-Reinigung

DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Molekülen aus einem Agarose-Gel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN (Hilden, D) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die gereinigte DNA war für Klonierungen (2.3.5) einsetzbar und konnte bei -20 °C für längere Zeit gelagert werden.

Plasmid-Isolierung

Zur Isolierung von geringen Plasmid-DNA-Mengen (*Miniprep*) wurde das mi-Plasmid Miniprep Kit von Metabion (Planegg, D) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde im letzten Schritt mit 65 °C warmen H₂O_{dd} eluiert an Stelle des mitgelieferten Elutions-Puffers.

2.3.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde durch photometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Verwendung des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometers von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) bei einem Probenvolumen von 2 µL ermittelt. Für doppelsträngige DNA entspricht eine bei 260 nm gemessene Extinktion von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/mL. Mit folgender Formel konnte die DNA-Konzentration bestimmt werden:

$$c = A_{260} \times 50 \times d$$

Formel 1

c	DNA-Konzentration (µg/mL)
d	Verdünnungsfaktor
A_{260}	Absorption bei $\lambda = 260$ nm

Zur Bestimmung der DNA-Reinheit wurde zusätzlich eine Absorptionsmessung bei 280 nm durchgeführt. Bei dieser Wellenlänge liegt das Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren, wodurch eine Kontamination mit Protein festgestellt werden konnte. Lag der Wert A_{260}/A_{280} zwischen 1,5 und 2,0 wies dieser Quotient auf eine saubere DNA-Probe hin.

2.3.5 DNA-Klonierung

Zur DNA-Klonierung wurden ggf. zunächst die entsprechenden Sequenzen mittels PCR amplifiziert (2.3.1) oder entsprechend gereinigte DNA eingesetzt (0). Bei Verwendung des Klonierungs-Kits CloneJET™ PCR Cloning Kit von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) erfolgten alle Schritte nach Angaben des Herstellers.

Restriktionsverdau

Zur Klonierung und Umklonierung eines Inserts wurde ein Restriktionsverdau von gereinigter DNA mittels ausgewählter Endonukleasen von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) durchgeführt. Hierbei wurden das zu klonierende Fragment in einem 20 µL-Ansatz sowie der Zielvektor in einem 50 µL-Ansatz mit den gleichen Restriktionsendonukleasen in einem Doppel-Verdau linearisiert. Die Aktivität verschiedener Endonukleasen ist von der Temperatur und der Pufferzusammensetzung abhängig. Ein Doppel-Verdau erfolgte jeweils im empfohlenen Puffer des Herstellers New England Biolabs (Ipswich, MA, USA). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 1-2 h. Im Anschluss wurde der Verdau mit einem DNA-

Marker in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel eluiert (2.3.3).

Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung eines linearisierten Vektors wurde die alkaline Phosphatase CIP (*alkaline phosphatase, calf intestinal*) von New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Während der Dephosphorylierung wurden Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt, die für eine Ligation benötigt werden, sodass linearisierter und dephosphorylierter Vektor nur durch eine Ligation mit DNA-Fragmenten, welche noch phosphoryliert vorlagen, zirkulieren konnte. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 2 h. Da die CIP nicht hitzeinaktiviert werden konnte, wurde die DNA

Ligation

Zur Ligation von verdauten DNA-Fragmenten wurde das Rapid DNA Ligation Kit von Fermentas (St. Leon Roth, D) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Für eine Ligation eines linearisierten Vektors mit einem DNA-Fragment wird ein molares Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA von 1:3 empfohlen. Um Religationen des Vektors zu vermeiden wurde ggf. vor der Ligation die linearisierte Vektor-DNA dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und konnte direkt transformiert werden.

2.3.6 Herstellung chemokompetenter Zellen und Transformation

Herstellung chemokompetenter Zellen

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen wurde eine flüssige Bakterienkultur des benötigten *E. coli*-Stammes in 100 mL kultiviert (2.2.4). Nach dem Erreichen einer OD₅₇₈ von 0,6 wurde diese für 10 min auf Eis gestellt und anschließend bei 3.880 xg für weitere 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Bakterienpellet nach Resuspension in 10 mL 100 mM CaCl₂ und 10 % (w/v) Glycerin 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschließend erneut in einen 3.880 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 mL 100 mM CaCl₂ und 10 % (w/v) Glycerin resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden als 50 bzw. 100 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation

Für eine Transformation wurden 50-100 µL kompetente Zellen vorsichtig mit 0,5-1 µL der zu transformierenden DNA gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Bei der Transformation eines Ligationsansatzes wurden im Gegensatz dazu bis zu 10 µL DNA eingesetzt. Nach der Anlagerung der DNA während der Inkubation auf Eis, wurde diese durch 1 min Hitzeschock bei 42 °C in die kompetenten Zellen aufgenommen. Der Transformationsansatz wurde n Anschluss nochmals für 2 min auf Eis gestellt und mit 500 µL Standard-LB-Flüssigmedium versetzt. Bei 37 °C wurden die Zellen anschließend im Schüttler für 60 min inkubiert, um ihre Stoffwechselaktivität zu aktivieren, bevor sie auf Selektivmedium ausgestrichen wurden (2.2.4).

2.3.7 DNA- Sequenzierung

Die generierten Plasmide dieser Arbeit wurden auf die Richtigkeit der Abfolge der Desoxyribonukleotide ihres jeweiligen Inserts durch GATC Biotech (Konstanz, D) überprüft. Die zu überprüfende DNA wurde mit einer Konzentration von 50-100 ng/µL und ggf. mit den entsprechenden Primern in einer Konzentration von 10 pmol/µL versendet. Die Ergebnisse konnten mit der Software Lasergene® SeqMan Pro von DNASTAR (Madison, WI, USA) ausgewertet werden.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Zellaufschluss und Generierung eines zellfreien Extrakts

Zellsuspensionen von 15 mL bis max. 35 mL Endvolumen wurden durch das Verfahren der Hochdruckentspannung mit der FRENCH Press von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) aufgeschlossen.

Die im jeweiligen Puffer resuspendierten Zellen wurden in das Zellaufschluss-System überführt und in einem Durchgang mit 16.000 psi Arbeitsdruck in der Zelle (\pm 1.000 psi Systemdruck) aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation bei 132.000-147.000 xg (\pm 38.000 - 40.000 rpm bei Rotor Ti 70.1) für 1 h bei 4 °C wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen von anderen Zellbestandteilen getrennt. Der zellfreie Überstand wurde vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen und ggf. mittels Ultraschall zweimal für jeweils 1 min (4x 10 %; 60 power) homogenisiert.

Der Aufschluss von Zellsuspensionen von 150 µL erfolgte für 10 min in einem 2 mL Reaktionsgefäß unter Zugabe von Glaskörnern mit dem Disruptor Genie von Scientific Industries (Bohemia, NY, USA). Im Anschluss wurden die Glaskörner durch Zentrifugation bei 16.100 xg für 10 min entfernt.

2.4.2 Metallionen-Affinitätschromatographie

Proteine mit angefügtem His-Tag wurden über diesen von anderen in Lösung befindlichen Komponenten durch eine Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) getrennt. Die Reinigung erfolgte mit Protino® Ni-NTA Agarose von MACHEREY-NAGEL (Düren, D) in Anlehnung an die Angaben des Herstellers.

Das Ni-NTA-Säulenmaterial wurde mit 5 cV des entsprechenden Protein-Puffers äquilibriert und im Anschluss mit zellfreiem Extrakt (2.4.1) beladen. Das Säulenmaterial wurde nach der Passage des Extrakts mit 10 cV Protein-Puffer oder Wasch-Puffer gewaschen und das Zielprotein bzw. die Zielproteine mit 5-10 cV Elutions-Puffer eluiert. Die Elutionsfraktionen von 500-2.000 µL wurden gesammelt, mittels SDS-PAGE (2.4.3) analysiert und die relevanten Fraktionen in Imidazol freien Protein-Puffer umgepuffert (2.4.4).

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts (Laemmli, 1970).

Zur Auftrennung wurden die Protein-Proben zunächst in 2x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 aufgenommen, für 5 min bei 95 °C erhitzt kurz abzentrifugiert und jeweils 10 µL aufgetragen. Zellpellets, welche aus 1 mL Kultur gewonnen wurden, wurden in 100 µL 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Zur Ermittlung der relativen molekularen Masse wurden zusätzlich jeweils 5 µL eines Markers aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30-35 mA pro Mini-Gel für 40-50 min in 1x SDS-Puffer.

12 % bzw. 15 % Acrylamid-Trenngel (ausreichend für 6 Mini-Gele)

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 25,3 mL:
H ₂ O _{dd}	-	8,75 mL / 6,25 mL
Acrylamid (Gel 30)	12 % / 15 %	10 mL / 12,5 mL
2M Tris (pH 8,8)	371 mM	6,25 mL
10 % APS	0,1 %	250 µL
TEMED	0,1 %	25 µL

6 % Acrylamid-Sammelgel (ausreichend für 6 Mini-Gele)

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 9,86 mL:
H ₂ O _{dd}	-	5,25 mL
Acrylamid (Gel 30)	5 %	2,0 mL
1M Tris-HCl (pH 6,8)	127 mM	2,5 mL
10 % APS	0,1 %	100 µL
TEMED	0,1 %	10 µL

10x SDS-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 2 Liter:
Tris-Base	250 mM	60,6 g
Glycin	1,92 M	288 g
SDS	1 % (w/v)	20 g

→ ad. 2 Liter H₂O_{dd}

2x SDS-Probenpuffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 60 mL:
1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	100 mM	4 mL
80 % Glycerin	40 %	30 mL
β -Mercaptoethanol	10 %	6 mL
20 % SDS	3,2 %	9,6 mL
Bromphenolblau	0,2 %	120 mg

→ ad. 60 mL H₂O_{dd}**Proteinfärbung mit Coomassie® Brilliant Blue**

Um Protein-Banden in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen, wurden sie mit Coomassie® Brilliant Blue gefärbt. Zur Färbung wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie-Färbelösung bedeckt und für 1 min bei 360 W in der Mikrowelle erhitzt, gefolgt von 10 min Inkubation auf einem Schüttler. Die Färbelösung wurde nach Ablauf der Inkubationszeit entfernt und das Gel mit H₂O gespült. Um den überschüssigen Farbstoff im Gel zu entfernen wurde dieses mit Coomassie-Entfärber bis zu einem klaren Hintergrund und der gewünschten Farbtintensität der Proteinbanden entfärbt. Das Gel wurde dazu in der Entfärbe-Lösung für 1 min bei 360 W in der Mikrowelle erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur auf dem Schüttler abgekühlt. Die entfärbten Gele konnten zur Dokumentation digitalisiert und getrocknet konserviert werden.

Coomassie-Färbelösung

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
Coomassie® Brilliant Blue G250	0,32 %	13,2 g
Eisessig	10 %	100 mL
Isopropanol	25 %	250 mL

→ ad. 1 Liter H₂O_{dd}**Coomassie-Entfärber**

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
Eisessig	10 %	100 mL
Ethanol	30 %	300 mL

→ ad. 1 Liter H₂O_{dd}

2.4.4 Pufferaustausch über eine NAPTM-Entsalzungssäule

Zur Reinigung von Proteinen aus einem Puffersystem wurde entsprechend des vorliegenden Volumens eine Illustra NAPTM-25 oder eine Illustra NAPTM-5 Entsalzungssäule von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) eingesetzt. Die Verwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers um Proteine zu entsalzen bzw. einen Pufferwechsel durchzuführen.

2.4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Photometrische Messung (Absorption bei 280 nm)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung durch photometrische Messung beruht auf dem Absorptionsmaxima der aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y) bei einer Wellenlänge von 280 nm. Da Proteine sich in der Zusammensetzung ihrer Aminosäuren unterscheiden, wurde vor einer Konzentrationsbestimmung der Anteil der jeweiligen Aminosäuren und des daraus resultierenden molaren Absorptionskoeffizienten mit der Software Lasergene® Protean Pro von DNASTAR (Madison, WI, USA) bestimmt.

Die Proteinkonzentration konnte durch Einsetzen der berechneten Parameter in eine Umstellung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet werden (Formel 2).

$$c = \frac{A_{280} \times MW}{\epsilon \times d}$$

Formel 2

ϵ	molarer Absorptionskoeffizient ($\text{Lcm}^{-1} \text{mol}^{-1}$)		
c	Proteinkonzentration (mg/mL)	MW	Molekulargewicht (Da)
d	Küvettenlänge (cm)	A_{280}	Absorption bei 280 nm

Bradford Proteinbestimmungstest

Eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen ist der Bradford Protein Assay (Bradford, 1976). Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie® Brilliant Blue G-250 an Proteine, die sich in saurem Milieu befinden, wird dessen Absorptionsmaximum von 465 auf 595 nm verschoben und kann mit einem Photometer detektiert werden.

Unter der Verwendung von BSA-Standards verschiedener Konzentrationen (100, 150, 250, 500, 750 und 1000 $\mu\text{g/mL}$) wurde zunächst eine lineare Eichkurve erstellt um dadurch die Konzentration des zu testenden Proteins zu ermitteln. Zur Konzentrationsbestimmung einer Proteinprobe wurden jeweils 10 μL Probenvolumen zweier unterschiedlicher

Verdünnungstufen (z.B. 1:2, 1:3, 1:4) in eine 96-Well Platte vorgelegt. Die beiden BSA-Standardreihen und die Proteinproben wurden mit jeweils 250 µL Bradford-Reagenz gemischt und nach einer Inkubationszeit von 10 min im iMark™ Microplate Reader von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 595 nm sowie einem 415 nm-Fliter gemessen. Durch die BSA-Eichgerade (Formel 3) konnte später die Proteinkonzentration der Proben rechnerisch ermittelt werden (Formel 4).

$$f(x) = a \times x$$

Formel 3

$$c = \frac{A_{595}}{a} \times 200 \times \text{Verdünnung}$$

Formel 4

a	Steigung der Eichgeraden
c	Proteinkonzentration (µg/mL)
A_{595}	Absorption bei 595 nm

2.4.6 Proteinkonzentrierung

Zur Konzentrierung von geringen Proteinvolumen wurden Amicon® Ultra Zentrifugenfilter von Merck Millipore (Cork, IRL) mit 500 µL Probenvolumen verwendet. Größere Proteinvolumen von 10 mL bis 50 mL wurden anaerob mit der Rührzelle Amicon®, ebenfalls von Merck Millipore (Cork, IRL), aufkonzentriert. Aerobe Proteinvolumen wurden mit dem Vivaspin® Zentrifugen-Konzentrator von Vivaproducts (Littleton, MA, USA) mit einem Füllvolumen von 20 mL aufkonzentriert.

Die Konzentratoren wurden mit Protein-Puffer äquilibriert und nach Herstellerangaben verwendet bis das gewünschte Probenvolumen erreicht worden ist.

2.4.7 Gelpermeationschromatographie am Äkta™ Purifier

Eine Gelpermeationschromatographie (GPC) wurde mit der Säule Superdex™ 200 10/300 GL von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) analytisch durchgeführt um die molekulare Proteinmasse zu ermitteln sowie um Oligomerisation nachzuweisen.

Eine präparative GPC mit der Säule HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200pg, ebenfalls von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK), wurde durchgeführt um verschieden große Proteine aus einem Proteingemisch vom gewünschten Zielprotein zu separieren oder um eine monomere Proteinlösung zu erlangen.

Das Äkta™ Purifier System wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min zunächst mit 1,5 cV H₂O_{dd} gespült und anschließend mit 2 cV des entgasten und filtrierten Protein-Puffers äquilibriert. Die eingesetzten Proteinlösungen wurden vor der Injektion bei durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert um kleinste Partikel sowie aggregiertes Protein von der Probe zu trennen.

Zur präparativen GPC wurden die Proteine mit einer Flussrate von 1 mL/min mit 1,2 cV Protein-Puffer eluiert und in 2 mL Fraktionen gesammelt. Bei der analytischen Methode wurden neben der Proteinlösung zudem Proteinstandards von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) appliziert und mit 1,1-1,3 cV und einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. Der Verlauf der Reinigung wurde durch einen UV-Detektor mit den Wellenlängen 280 nm und 420 nm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden in Anschluss durch eine SDS-PAGE (2.4.3) analysiert und ggf. zusammengeführt.

2.4.8 Proteinreinigung über Blue Sepharose am Äkta™ Purifier

Zur ersten Proteinreinigung von RS- Proteinen wurde eine HiTrap™ Blue HP Säule von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) eingesetzt. Die Matrix bindet eine Vielzahl an Molekülen, darunter auch Proteine, welche Nukleotidcofaktoren besitzen.

Das Äkta™ Purifier System wurde mit einer für die Methode kompatiblen Flussgeschwindigkeit im Ausgangspuffer A analog zur GPC (2.4.7) äquilibriert, sodass der resultierende Säulendruck den maximalen Arbeitsdruck des Herstellers nicht überstieg. Der eingesetzte zellfreie Extrakt wurde vor der Injektion über einen 50 mL Superloop von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert.

Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min mit 10 cV Puffer A gewaschen bevor gebundene Proteine über einen linearen Gradienten von 0 M NaCl (\triangleq 100 % Puffer A) bis 1 M NaCl (\triangleq 50 % Puffer B) über 10 cV eluiert wurden. Der Verlauf der Reinigung wurde durch einen UV-Detektor mit den Wellenlängen 280 nm und 410 nm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden in Anschluss durch eine SDS-PAGE (2.4.3) analysiert und die relevanten Proteinfraktionen zusammengeführt.

Puffer A:

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**Puffer B:**

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL
5 M NaCl	2 M	400 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**2.4.9 Anionenaustauschchromatographie am Äkta™ Purifier**

Ein zweiter Proteinreinigungsschritt von RS- Proteinen über einen Anionentauscher wurde mit der Säule Mono Q™ 5/50 GL von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) durchgeführt. Die Matrix ist hierbei positiv geladen und bindet negativ geladene Moleküle wie z.B. Proteine.

Das Äkta™ Purifier System wurde mit einer für die Methode kompatiblen Flussgeschwindigkeit im Ausgangspuffer C analog zur GPC (2.4.7) äquilibriert, sodass der resultierende Säulendruck den maximalen Arbeitsdruck des Herstellers nicht überstieg. Die Proteinlösung aus dem ersten Reinigungsschritt (2.4.8), welche in Puffer C umgepuffert worden ist, wurde vor der Injektion über einen 10 mL Superloop von GE Healthcare (Buckinghamshire, UK) durch einen Membranfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert.

Die Säule wurde mit 10 cV Puffer C zunächst gründlich gewaschen bevor gebundene Proteine über einen linearen Gradienten von 0 M NaCl (\triangleq 100 % Puffer C) bis 0,5 M NaCl (\triangleq 50 % Puffer D) über 20 cV eluiert wurden. Der Verlauf der Reinigung wurde durch einen UV-Detektor mit den Wellenlängen 280 nm und 410 nm aufgezeichnet. Die Fraktionen wurden in Anschluss durch eine SDS-PAGE (2.4.3) analysiert und die relevanten Proteinfaktionen zusammengeführt.

Puffer C:

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**Puffer D:**

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL
5 M NaCl	1 M	200 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**2.4.10 *In-vivo*-Enzymtest von Ahb-NirD, NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2**

Der *in-vivo*-Aktivitätstest verschiedener exprimierter Gene aus *M. barkeri* wurde anaerob in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt, welche das Plasmid pBCM_cysG6 zur Produktion von CysG aus *Salmonella typhimurium* enthielten. Zusätzlich enthielten die Zellen entweder das Plasmid pET22bnirDHJ1J2 zur Produktion von AhbAB, AhbC und AhbD, pET22bnirDHJ1_{t78a}J2 zur Produktion von Ahb-NirD, NirH und Ahb-NirJ2 oder pET22bnirDHJ1J2_{a76t} zur Produktion von Ahb-NirD, NirH und Ahb-NirJ1.

Die Zellen wurden in 125 mL Anaerobenflaschen in 100 mL LB-Flüssigmedium unter Zugabe von Chloramphenicol, Ampicillin und Natriumnitrat kultiviert (2.2.4). Bei einer OD₅₇₈ von 0,2 wurde die Bakterienkultur mit einer Endkonzentration von 500 µM IPTG und 0,01 % Arabinose induziert und üN bei 25 °C weiter inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen anaerob bei 3.000 xg für 15 min bei 4 °C pelletiert. Die Zellen wurden in TBS-Puffer resuspendiert und in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, bevor sie erneut bei 5.000 xg für 2 min zentrifugiert wurden. Nach dem Dekantieren überschüssigen Puffers wurden die Zellpellets gewogen und entweder bei -20 °C gelagert oder direkt aufgeschlossen. Vor dem Aufschluss wurden die Zellpellets in Zelltest-Puffer im Verhältnis 1:3 (w/v) aufgenommen. Für den Zellaufschluss wurde jeweils 150 µL der resultierenden Zellsuspension eingesetzt (2.4.1).

TBS-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 500 mL:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	25 mL
5 M NaCl	150 mM	15 mL

→ ad. 500 mL H₂O_{dd}**Zelltest-Puffer**

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 500 mL:
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	25 mL
20 % Tween 80	2 %	50 mL

→ ad. 500 mL H₂O_{dd}

Nach dem Aufschluss wurden 200 µL Überstand mit 450 µL Aceton/HCl (39:1 (v/v)) gemischt und die Probe für 10 min gevortext um Tetrapyrrole aufzuschließen und Protein zu Präzipitieren. Danach wurden die Proben bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert und der Überstand in einer Vakuum-Zentrifuge von Eppendorf (Hamburg, D) auf ein Endvolumen von 200 µL konzentriert. Eine Zugabe von 5 % (v/v) konzentrierter HCl und eine weitere Zentrifugation bei 16.100 xg für 10 min erfolgte, bevor der Überstand zur Analyse für eine HPLC (2.4.14) verwendet wurde.

2.4.11 Rekombinante Proteinproduktion und Reinigung von AhbAB

Die rekombinante Produktion der Proteine AhbA und AhbB aus *M. barkeri* erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3), welcher das Plasmid pETDuetnirDB enthielt. Die Kultivierung (2.2.4) erfolgte in insgesamt 2 L LB-Flüssigmedium (4x 500 mL in je einem 1 L-Kolben) unter Zugabe von Ampicillin. Bei einer OD₅₇₈ von 0,5 wurde die Bakterienkultur mit einer Endkonzentration von 500 µM IPTG induziert und weitere 4 h bei 37 °C bei 100 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 3.000 xg für 15 min bei 4 °C pelletiert. Nach Zugabe von 50 mL Zellwasch-Puffer wurden die Zellen auf zwei 50 mL-Falcon™-Röhrchen aufgeteilt und erneut bei 3.000 xg für 15 min bei 4 °C pelletiert bevor sie bei -20 °C gelagert wurden.

Das aufgetaute Zellpellet wurde in 20 mL AhbAB-Puffer resuspendiert, mit 1 mM PMSF versehen und aufgeschlossen (2.4.1). Die Proteine AhbAB wurden über IMAC (2.4.2) mit einem Ni-NTA-Säulenvolumen von 1 mL gereinigt. Vor dem Elutionsschritt wurde eine zusätzliche Prä-Elution von 2 cV mit dem Prä-Elutions-Puffer durchgeführt.

Zellwasch-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 500 mL:
5 M NaCl (\triangleq 29,2 %)	0,9 %	15,4 mL
80 % Glycerin	10 %	62,5 mL

→ ad. 500 mL H₂O_{dd}**AhbAB-Puffer**

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
5 M NaCl	150 mM	30 mL
80 % Glycerin	10 %	125 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**AhbAB-Prä-Elutions-Puffer** \triangleq AhbAB-Puffer mit 50 mM Imidazol**AhbAB-Elutions-Puffer** \triangleq AhbAB-Puffer mit 300 mM Imidazol**2.4.12 Rekombinante Proteinproduktion und Reinigung von AhbD****Natives AhbD aus *M. barkeri***

Die rekombinante Produktion von AhbD aus *M. barkeri* erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3), welcher das Plasmid pETDuetahbD enthielt. Die Kultivierung (2.2.4) erfolgte in insgesamt 3 L LB-Flüssigmedium (6x 500 mL in je einem 1 L-Kolben) unter Zugabe von Ampicillin. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Bakterienkultur mit einer Endkonzentration von 500 μ M IPTG induziert und üN bei 25 °C bei 100 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h in einer Anaeroben-Werkbank anaerobisiert, bevor sie bei 3.000 xg für 30 min bei 4 °C pelletiert wurden. Alle weiteren Schritte verliefen im Anschluss weiterhin unter anaeroben Bedingungen (2.2.2).

Die Zellpellets wurden in 40 mL AhbCD-Puffer resuspendiert und aufgeschlossen (2.4.1). Der zellfreie Extrakt wurde mittels Äkta™ Purifier System zunächst auf eine Blue Sepharose Säule (2.4.8) aufgetragen und ein erster Reinigungsschritt erfolgte. Die Fraktionen, in denen sich AhbD befand, wurden mittels SDS-PAGE (2.4.3) ermittelt, vereinigt und aufkonzentriert (2.4.6). Nach einem Pufferwechsel in Puffer C um die Proteinlösung zu entsalzen (2.4.4) wurde diese erneut durch das Äkta™ Purifier System auf einen Anionenaustauscher appliziert (2.4.9). In Anschluss an diesen zweiten Reinigungsschritt wurden ebenfalls alle Fraktionen

mit AhbD, welche sich durch ihre Elution in einem Puffergemisch aus Puffer C und Puffer D befanden, vereinigt, in Puffer CD aufkonzentriert und bei 4 °C gelagert.

AhbCD-Puffer:

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
10 % Triton X-100	0,3 %	30 mL
1 M DTT	2 mM	2 mL
5 M NaCl	250 mM	50 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}

Puffer C:

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}

Puffer CD:

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 Liter:
1 M Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM	50 mL
1 M DTT	5 mM	5 mL
5 M NaCl	20 mM	4 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}

AhbD und AhbD-Varianten mit N-terminalem His-Tag aus *M. barkeri*

Die rekombinante Produktion von AhbD aus *M. barkeri* sowie deren Varianten erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3), welcher entweder das Plasmid pETDuetahbD/HIS, pETDuetahbDp.C19,23A/HIS oder pETDuetahbDp.C321,324A/HIS enthielt. Die Kultivierung (2.2.4) erfolgte in insgesamt 3 L LB-Flüssigmedium (jeweils 3x 1 L in je einem 2 L-Kolben) unter Zugabe von Ampicillin. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurde die Bakterienkultur mit einer Endkonzentration von 500 µM IPTG induziert und üN bei 25 °C bei 100 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 3.000 xg für 30 min bei 4 °C pelletiert, mit AhbD-Puffer gewaschen und bis zur Verwendung als trockenes Zellpellet bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Pellet in AhbD-Wasch-Puffer aufgenommen, aufgeschlossen und mittels Ultraschall homogenisiert (2.4.1). Eine Proteinreinigung erfolgte über IMAC unter Verwendung von 3 mL Ni-NTA-Säulenvolumen (2.4.2).

AhbD-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 L:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
5 M NaCl	300 mM	60 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}**AhbD-Wasch-Puffer** ≙ AhbD-Puffer mit 20 mM Imidazol**AhbD-Elutions-Puffer** ≙ AhbAB-Puffer mit 250 mM Imidazol

Das gereinigte Protein wurde im Anschluss anaerobisiert (2.2.2) und dessen (Shemin & Kumin)-Cluster chemisch rekonstituiert (2.4.16).

AhbD mit N-terminalem His-Tag aus *M. sedula*

Die rekombinante Produktion von AhbD aus *M. sedula* erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3), welcher das Plasmid pETDuet_1_nirJ1_msed enthielt. Die Durchführung erfolgte zunächst analog zur Reinigung von AhbD aus *M. barkeri* (2.4.12).

Zur Optimierung der Reinigungsschritte, wurde der zellfreie Extrakt zu gleichen Teilen aufgeteilt und entweder für 15 min auf Eis inkubiert oder im Wasserbad auf 65 °C für 15 min erhitzt. Im Anschluss wurde potentiell denaturiertes Protein bei 4.000 xg für 15 min bei 4 °C pelletiert, der Überstand abgekühlt und erneut bei 4.000 xg für 10 min bei 4 °C zentrifugiert bevor die Proben in einer IMAC (2.4.2) eingesetzt wurden. Das gereinigte Protein wurde im Anschluss anaerobisiert (2.2.2) und dessen [Fe-S]-Cluster chemisch rekonstituiert (2.4.16).

2.4.13 UV/Vis-Spektroskopie

Eine UV/Vis-Spektroskopie wurde je nach Anwendung aerob oder anaerob an einen V-650 Spektrophotometer von JASCO® (Groß-Umstadt, D) durchgeführt um Absorptionsspektren von Proteinen und Porphyrinen aufzuzeichnen. Die Probenlösungen wurden je nach Konzentration in Quarzküvetten der Schichtdicke 10 mm oder 1 mm gemessen. Eine Reduktion der Proben erfolgte ggf. durch Zugabe von Natriumdithionit.

2.4.14 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Eine Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde an einer JASCO 2000 Anlage von JASCO® (Groß-Umstadt, D) mit einem UV-Detektor und einem Fluoreszenzdetektor bei 25 °C durchgeführt um verschiedene Tetrapyrrole oder Desoxyadenosin zu detektieren. Die Probenvorbereitung erfolgte abhängig von der Analysenmethode und der jeweiligen Probenlösung. Die Proben wurden alle automatisiert in das System injiziert und mit Lösemitteln in HPLC-Qualität von der Säule eluiert.

Methode zur Detektion von Häm und Metalloporphyrinen

Die Detektion von Häm und Metalloporphyrinen erfolgte mit einer Equisil BDS C18-2 Säule von Dr. Maisch (Ammerbuch-Entringen, D). Die Substanzen wurden über einen Methanolgradienten bestehend aus drei verschiedenen Lösungsgemischen mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 mL/min von der Säule eluiert. Lösung A bestand hierbei aus 1 M Ammoniumacetat (pH 5,2), Lösung B aus Methanol, Lösung C aus Acetonitril. Zur Detektion wurde die Absorption der Wellenlängen von 200-650 nm aufgezeichnet sowie die Fluoreszenz (Anregung bei 409 nm, Emission bei 630 nm) gemessen. Injiziert wurden jeweils 30 µL einer Probe. Eine Reäquilibration der Säule erfolgte im Anschluss für 15 min.

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)	Lösung C (%)
1	60	30	10
25	15	75	10
30	0	90	10
50	0	90	10

Methode zur Detektion von Sirohäm und Didecarboxysirohäm

Die Detektion von Sirohäm und 12,18-Didecarboxysirohäm erfolgte mit einer Reprosil-Pur C18-AQ Säule von Dr. Maisch (Ammerbuch-Entringen, D). Die Substanzen wurden über einen Acetonitrilgradienten bestehend aus zwei verschiedenen Lösungsgemischen mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,2 mL/min von der Säule eluiert. Lösung A bestand hierbei aus 0,01 % Ameisensäure in H₂O_{dd} und Lösung B aus Acetonitril. Zur Detektion wurde die Absorption der Wellenlängen von 200-650 nm aufgezeichnet sowie die Fluoreszenz (Anregung bei 409 nm, Emission bei 630 nm) gemessen. Eine Reäquilibration der Säule erfolgte im Anschluss für 10 min.

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
0,1	95	5
6	80	20
25	70	30
30	0	100
40	0	100

Methode zur Detektion von Desoxyadenosin

Die Detektion von Desoxyadenosin erfolgte mit einer Hypercarb Säule von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,2 mL/min und einem Gradienten aus zwei Lösungen. Lösung A bestand hierbei aus 0,1 % TFA in H₂O_{dd} und Lösung B aus 0,08 % TFA in Acetonitril. Zur Detektion wurde die Absorption der Wellenlängen von 200-650 nm aufgezeichnet. Eine Reäquilibration der Säule erfolgte im Anschluss für 7 min.

Zeit (min)	Lösung A (%)	Lösung B (%)
1	100	0
25	0	100
30	0	100

2.4.15 Eisen- und Schwefel-Konzentrationsbestimmung

Photometrische Messung (Absorption bei 410 nm)

Die Konzentration von Eisen-Schwefelzentren konnte durch photometrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 410 nm unter Verwendung eines bereits zuvor aufgenommenen UV/Vis-Spektrums (2.4.13) durchgeführt werden. Mit einem molaren Absorptionskoeffizienten von 15.000 Lcm⁻¹ mol⁻¹ (Duin *et al.*, 1997), des Molekulargewichts von 351,62 Da und folgender Formel konnte die Konzentration von [4Fe-4S]- Clustern in einer gereinigten Proteinlösung bestimmt werden:

$$c = \frac{A_{410} \times MW}{\epsilon \times d}$$

Formel 5

ϵ	molarer Absorptionskoeffizient (Lcm ⁻¹ mol ⁻¹)		
c	Proteinkonzentration (mg/mL)	MW	Molekulargewicht (Da)
d	Küvettenlänge (cm)	A_{410}	Absorption bei 410 nm

Eisen-Bestimmungstest

Eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung des Eisengehalts ist ein Fe-Bestimmungstest (Fish, 1988). Unter der Verwendung eines Fe-Standards wurden Lösungen verschiedener Eisenmengen generiert (0; 0,5; 1; 2; 4; und 8 nmol). Durch diesen Standard wurde eine lineare Eichkurve erstellt um die Fe-Konzentration in einer Proteinlösung zu ermitteln. 20 µL sowie 40 µL oder 10 µL sowie 20 µL Proteinlösung wurden je nach Proteinkonzentration entnommen. Zur Konzentrationsbestimmung wurde jeweils 65 µL Probenendvolumen eingesetzt.

Die beiden Fe-Standardreihen und die Proteinproben wurden mit jeweils 45 µL 1 M PCA gemischt, kurz gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 9.300 xg für 5 min zentrifugiert, 90 µL Überstand entnommen und dieser mit 72 µL von frisch angesetzttem Bathophenantrolin-Disulfat (1,7 mg/mL) versehen. Des Weiteren wurden 36 µL von frisch angesetzttem Natriumascorbat (38 mg/mL) sowie 27 µL von 1:3 verdünnter gesättigter Ammoniumacetat-Lösung hinzugefügt und erneut gevortext. Nach 30 min Inkubationszeit bei RT wurden die Proben bei 9.300 xg für 5 min zentrifugiert und 100 µL Überstand für eine Messung entnommen.

Die Proben wurden in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm in einem V-650 Spektrophotometer von JASCO® (Groß-Umstadt, D) bei einer Wellenlänge von 535 nm und 680 nm gemessen. Beide Absorptionen wurden voneinander subtrahiert wodurch eine lineare Fe-Eichgerade generiert und der Fe-Gehalt der Proben (Formel 6) rechnerisch ermittelt werden konnte.

$$n = \frac{A_{(535-680)}}{a}$$

Formel 6

a	Steigung der Eichgeraden
n	Stoffmenge (nmol)
$A_{(535-680)}$	Differenz der Absorptionen bei 535 und 680 nm

Schwefel-Bestimmungstest

Eine kolorimetrische Methode zur Konzentrationsbestimmung des Schwefelgehalts ist ein S-Bestimmungstest (Beinert, 1983). Unter der Verwendung von Lithiumsulfid wurde eine Standardreihe mit verschiedenen Sulfidmengen (0; 1; 5; 10; 15 und 20 nmol) generiert wodurch eine lineare Eichkurve erstellt werden konnte. 50 µL und 75 µL oder 25 µL sowie

50 µL Proteinlösung wurden je nach Proteinkonzentration entnommen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde jeweils 100 µL Probenendvolumen eingesetzt. Die beiden S²⁻-Standardreihen und die Proteinproben wurden sofort hintereinander mit jeweils 300 µL 1 % Zn-Acetat-Dihydrat und 15 µL 3 M NaOH gemischt, verschlossen, kurz gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 75 µL 0,1 % DMPD und 16 µL 23 mM FeCl₃ sofort nacheinander hinzugefügt, kurz gevortext, geschlossen und für mind. 3 h bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden danach bei 9.300 xg für 5 min zentrifugiert und 100 µL Überstand für eine Messung entnommen.

Die Proben wurden in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm in einem V-650 Spektrophotometer von JASCO® (Groß-Umstadt, D) bei einer Wellenlänge von 670 nm gemessen. Es wurde eine S²⁻-Eichgerade generiert und der S²⁻-Gehalt der Proben (Formel 7) rechnerisch ermittelt.

$$n = \frac{A_{670}}{a}$$

Formel 7

a	Steigung der Eichgeraden
n	Stoffmenge (nmol)
A_{670}	Absorption bei 670 nm

2.4.16 Rekonstitution von Eisen-Schwefel-Clustern

Eine Rekonstitution von [Fe-S]-Clustern erfolgte chemisch unter anaeroben Bedingungen (2.2.2) bei 17 °C mit einer Proteinkonzentration von 100-200 µM (Flühe *et al.*, 2012). Hierzu wurde das Protein zuvor entsprechend aufkonzentriert (2.4.6) und durch Zugabe von 10 mM DT Endkonzentration für 1 h inkubiert. Für zwei erwartete [4Fe-4S]-Cluster wurde der Proteinlösung die 10-fache Konzentration an Fe-Ammoniumcitrat und Lithiumsulfid zugefügt, wobei nach Zugabe von Fe-Ammoniumcitrat 5 min und nach Lithiumsulfid 35 min inkubiert wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 12.100 xg für 5 min um die Reaktion zu stoppen bevor die Proteinlösung umgepuffert wurde (2.4.4). Das rekonstituierte Protein wurde durch UV/Vis-Spektroskopie (2.4.13) sowie durch Fe- und S-Konzentrationsbestimmung (2.4.15) auf erfolgreiche Rekonstitution getestet.

2.4.17 *In-vitro*-Enzymtest für AhbAB

Der *in-vitro* Aktivitätstest für AhbAB aus *M. barkeri* wurde anaerob durchgeführt (2.2.2). Das Substrat Sirohäm wurde von Kristin Haufschildt *in vivo* in *E. coli* BL21(DE3) produziert, welche das Plasmid pBCM_cysG6 zur Produktion von CysG aus *Salmonella typhimurium* enthielten. Eine 500 μ M Hemin-Stammlösung (Chim *et al.*, 2010) wurde durch Einwaage von 0,4 mg Hemin generiert, welches in 50 μ L 0,1 M NaOH gelöst wurde und durch Zugabe von 50 μ L 1 M Tris-HCl (pH 8,0) und 900 μ L von Puffer CD ohne DTT neutralisiert wurde.

Zunächst wurden Sirohäm produzierende Zellen in AhbAB-Test-Puffer aufgenommen und ein zellfreier Extrakt generiert (2.4.1) und direkt für einen Enzymtest eingesetzt. Ein 250 μ L-Enzymansatz beinhaltete Endkonzentrationen von 20 μ M gereinigtem AhbAB (2.4.11), welches zuvor mit Hemin-Konzentrationen von 0 μ M, 5 μ M oder 20 μ M inkubiert wurde, sowie 75 μ L des zellfreien Extrakts. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 19 h inkubiert und im Anschluss 1:1 mit Aceton/HCl (39:1 (v/v)) gemischt, für 1 min gevortext und bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert. Zu 150 μ L Überstand wurden 5 % (v/v) konzentrierter HCl zugegeben und bei 16.100 xg für 10 min erneut zentrifugiert, bevor die Proben in einer HPLC (2.4.14) analysiert wurden.

AhbAB-Test-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 1 L:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM	50 mL
5 M NaCl	300 mM	60 mL
80 % Glycerin	5 %	62,5 mL

→ ad. 1 L H₂O_{dd}

2.4.18 *In-vitro*-Enzymtest für AhbD

Der *in-vitro* Aktivitätstest für AhbD aus *M. barkeri* wurde anaerob durchgeführt (2.2.2). Eine Stammlösung des Substrats Fe-Coproporphyrin III sowie der Substratanaloga Coproporphyrin III, Cu-Coproporphyrin III und Zn-Coproporphyrin III wurden analog zu einer Hemin-Stammlösung (2.4.17) hergestellt. Zn-Coproporphyrin III wurde im Vergleich zu den anderen Substanzen nicht kommerziell bezogen (2.5.1). Nach einer HPLC-Analyse aller Porphyrine diente das Integral der Substrat-Peakfläche als Vergleichskonzentration, wodurch die Konzentration des Zn-COPRO III ermittelt werden konnte. Eine Stammlösung der Ferredoxin-NADP⁺ Reduktase (FNR) aus *Spinacia oleracea* wurde generiert, indem 1 u

lyophilisierte FNR in 400 μ L 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gelöst wurden (\approx 2,5 u/mL). Von lyophilisiertem Ferredoxin (Fd) aus *Spinacia oleracea* wurde 1 mg in 300 μ L des gleichen Puffers gelöst (\approx 300 μ M). Beide Enzyme wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Der Enzymansatz beinhaltete eine Endkonzentration von 20 μ M Fe-COPRO III, 500 μ M - 1 mM SAM, 1 mM DT sowie 5 μ M gereinigtes AhbD in AhbD-Puffer. Als Ersatz für DT wurden 5 mU FNR, 9 μ M Fd und 0,6 mM NADPH verwendet.

Der Ansatz wurde bei 17 °C für 0-24 h inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 5 % (v/v) konzentrierter HCl hinzugefügt und der Ansatz bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben 1:1 mit Aceton/HCl (39:1 (v/v)) gemischt, für 1 min gevortext und bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert. Zu 150 μ L Überstand wurden 5 % (v/v) konzentrierter HCl zugegeben und bei 16.100 xg für 10 min erneut zentrifugiert, bevor die Proben in einer HPLC (2.4.14) analysiert wurden.

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen für das wt AhbD wurden vorab die Ansätze mit Fe-Copro III ebenfalls bei einer Temperatur von 30°C sowie 37°C inkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgte zusätzlich bei einem pH-Wert von 7,2 sowie pH 8,0 durch Anpassung des AhbD-Puffers.

2.4.19 S-Adenosylmethionin-Spaltungstest

Der S-Adenosylmethionin (SAM)-Spaltungstest für AhbD aus *M. barkeri* wurde analog zum *in-vitro*-Aktivitätstest für AhbD (2.4.18) mit jeweils 1 mM SAM durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 0-24 h wurde die Reaktion direkt bei -20 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Proben mit 5 % (v/v) konzentrierter HCl versetzt und für 1 min gevortext. Im Anschluss wurden sie bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert bevor sie zur Analyse für eine HPLC (2.4.14) verwendet wurden.

2.4.20 Bindungsstudien von AhbAB mit Häm

Dialyse von AhbAB

Die Häm-Bindung von gereinigtem AhbAB (2.4.11) wurde durch Dialyse und GPC analysiert. 100 μ L AhbAB wurden hierzu mit einer Konzentration von 7,8 mg/mL bei 4 °C üN gegen 100 mL AhbAB-Puffer in einem Slide-A-Lyzer von Thermo Fisher (Waltham, MA, USA) dialysiert. Es erfolgte eine erneute Dialyse bei 4 °C für weitere 3 h gegen neuen AhbAB-Puffer bevor die Probe durch eine GPC (2.4.7) auf gebundenes Häm getestet wurde.

Analyse von AhbAB durch HPLC

Zur Identifizierung von Häm in gereinigtem AhbAB wurde ein Hemin-Standard sowie extrahiertes Tetrapyrrol aus AhbAB verglichen. Zur Extraktion wurde gereinigtes AhbAB (2.4.11) 1:1 mit Zelltest-Puffer und 5 % (v/v) konzentrierter HCl gemischt und für 2 min gevortext. Im Anschluss wurde die Probe bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert und der resultierende Überstand 1:1 mit Aceton/HCl (39:1 (v/v)) gemischt bevor noch einmal bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde direkt für eine HPLC (2.4.14) eingesetzt. Hemin wurde in Form von Pulver mit 150 µL Aceton/HCl (39:1 (v/v)) gemischt bevor 75 µL Zelltest-Puffer hinzugefügt wurden. Der Standard wurde ebenfalls bei 16.100 xg für 10 min zentrifugiert und direkt in einer HPLC eingesetzt.

2.4.21 Bindungsstudien von AhbD mit Substrat und Substratanaloga

Die Bindung von Fe-Copro III, Copro III, Cu-Copro III sowie Zn-Copro III an AhbD aus *M. barkeri* wurde unter anaeroben Bedingungen (2.2.2) durch UV/Vis-Spektroskopie in einer Quarzküvette der Schichtdicke 10 mm getestet (2.4.13).

Zu einer verdünnten Substratlösung bzw. zu einer Substratanalagonlösung, welche in der Küvette vorgelegt wurde, wurde gereinigtes AhbD (2.4.12) direkt hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. In der vermessenen Probe befand sich eine Endkonzentration von 5 µM Substrat bzw. Substratanalagon und 10 µM bzw. 20 µM AhbD. Es wurden UV/Vis-Spektren direkt nach dem Mischen (0 - 100 s), nach 270 s (270 - 370 s) und nach 24 h aufgenommen.

2.4.22 Kristallisationsansätze von AhbD

Für AhbD-Kristallisationsansätze wurde gereinigtes AhbD aus *M. sedula* (2.4.12) eingesetzt. Erste anaerobe Screening-Versuche durch die *sitting-drop-vapor*-Diffusionsmethode wurden mit den Kristallisations-Kits NeXtal Tubes Cryos Suite, NeXtal Tubes JCSG Core I Suite und NeXtal Tubes JCSG Core II Suite von QIAGEN (Hilden, D) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst je 100 µL der jeweiligen Puffer aus den entsprechenden Kristallisations-Kits als Reservoir in eine 96-Well Kristallisationsplatte vorgelegt und diese für 45 min in der anaeroben Werkbank MACS-MG-1000 von Don Whitley (West Yorkshire, UK) anaerobisiert, bevor sie wieder mit kristallklarer Klebefolie verschlossen wurde.

Das mittels IMAC gereinigte Protein wurde über eine präparative GPC (2.4.7) von Aggregaten und unerwünschten Oligomeren getrennt, sodass die Monomer-Fractionen

gesammelt und vereinigt werden konnten. Die [Fe-S]-Cluster wurden erneut chemisch rekonstituiert (2.4.16), in Krist-Puffer überführt (2.4.4) und aufkonzentriert (2.4.6). 0,5 mg Fe-Copro III Standard wurden eingewogen und unter Zugabe von 20 μL 0,1 M NaOH gelöst. Im Anschluss wurden 813 μL Krist-Puffer hinzugefügt um speziell für die Kristallisationsexperimente eine höher konzentrierte Fe-Copro III-Lösung zu erhalten.

Für die erste Probe wurden 0,6 mg SAM in 300 μL von 288 μM AhbD aufgenommen ($\approx 5 \text{ mM}$ SAM). Eine zweite Probe wurde auf gleicher Weise generiert, Aber unter nochmaliger Aufkonzentrierung des Proteins und unter der Zugabe von 186 μL Fe-Copro III-Lösung. Nicht alles Fe-Copro III hatte sich gelöst und wurde abzentrifugiert bevor die Lösung für die Proben verwendet wurde. HPLC Standard-Läufe zur Konzentrationsberechnung ergaben eine Endkonzentration von 330 μM Fe-Copro III an Stelle der eigentlichen 465 μM . AhbD lag wie in der vorigen Probe in einer Endkonzentration von 288 μM vor. Für das Pipettieren der Ansätze wurden je 1 μL Probe mit 1 μL des entsprechenden Reservoirs gemischt und wieder mit kristallklarer Klebefolie verschlossen.

Krist-Puffer

Substanz:	Endkonzentration:	Menge für 500 mL:
1 M Tris-HCl (pH 7,5)	25 mM	12,5 mL
5 M NaCl	150 mM	15 mL
1 M DTT	5 mM	2,5 mL

→ ad. 500 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

2.5 Extern durchgeführte Methoden

2.5.1 Herstellung von Zink-Coproporphyrin III

Zn-Coproporphyrin III wurde durch Martin Hoffmann aus der AG von Prof. Dr. Martin Bröring am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig hergestellt. Als Ausgangssubstrat diente hierbei Coproporphyrin III von Frontier (Newark, DE, USA).

2.5.2 HPLC-Massenspektrometrie

Isotopische Massenspektren von Sirohäm und 12,18-Didecarboxysirohäm wurden mittels HPLC-Massenspektrometrie (HPLC-MS) von Alexander Neumann aus der AG von Prof. Dr. Stefan Schulz am Institut für Organische Chemie der TU Braunschweig durchgeführt. Die mittels HPLC aufgetrennten Tetrapyrrole (2.4.14) wurden mittels ESI-MS im positiven Ionenmodus detektiert.

2.5.3 Elektronenspinresonanz

Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektren von [4Fe-4S]-Proteinen wurden von Dr. Edward J. Reijerse am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim an der Ruhr aufgenommen.

Die Proteinproben wurden anaerob auf 380-450 μM in einem Probenvolumen von 300-350 μL aufkonzentriert und mit 10 mM DT versehen bevor sie in ESR-Probenröhrchen umgefüllt wurden. Direkt im Anschluss wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem Cryo-Lagerbehälter QWick 14/24 von MVE /Chart BioMedical (Ball Ground, GA, USA) verschickt.

2.5.4 Zyklische Voltammetrie

Die Messungen zur zyklischen Voltammetrie (CV) für [4Fe-4S]-Proteine erfolgte durch Peter Schweyen aus der AG von Prof. Dr. Martin Bröring am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig. Die Proteinproben wurden anaerob auf 120 μM in einem Probenvolumen von 100 μL aufkonzentriert, in HPLC-Probenfläschchen überführt und ggf. unter Zugabe verschiedener Additive μN inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss

unter einem Stickstoffstrom in eine anaerobe Messapparatur überführt und vermessen. Als Referenz-Elektrode wurde eine Silber/Silberchlorid-Elektrode (3 mol/L KCl), eine Glaskohlenstoff-Elektrode als Arbeits-Elektrode sowie ein Platindraht als Gegenelektrode. Vor jeder Messung wurde die Arbeitselektrode entsprechend präpariert (Aliverti *et al.*, 1995).

2.6 Bioinformatische Methoden

Es wurden verschiedene Programme zur bioinformatischen Analyse eingesetzt, darunter auch einige, die auf einem Online-Server angeboten werden.

Software	Verwendung	Referenz
NCBI-Datenbank (inkl. BLAST® und COBALT)	Datenbank zur Gen- und Protein-Analyse inkl. (multiple) Protein- Sequenzalignments	U.S. National Library of Medicine (Altschul <i>et al.</i> , 1990; Papadopoulos & Agarwala, 2007)
MGDB	Mikrobielle Genomdatenbank zur Vergleichende Analyse	(Uchiyama, 2003; Uchiyama, 2007; Uchiyama <i>et al.</i> , 2010; Uchiyama <i>et</i> <i>al.</i> , 2013)
I-TASSER	3D Proteinstruktur- Vorhersage	(Roy <i>et al.</i> , 2010; Zhang, 2008)
Protean DNA Star Lasergene	Proteinanalyse	DNASTAR Inc.
PyMOL	3D Proteinstruktur- Generierung	Schrödinger K.K.

3 Ergebnisse und Diskussion

Kurz nach Beginn dieser Arbeit wurde der Verlauf der alternativen Häm-Biosynthese anhand der funktionellen Charakterisierung der beteiligten Enzyme aus Sulfat-reduzierenden Bakterien aufgeklärt (Bali *et al.*, 2011). Die für die Umsetzung von Sirohäm zu Häm verantwortlichen Enzyme AhbAB, AhbC und AhbD stellten Homologe zu den zuvor in einer bioinformatischen Studie identifizierten Proteinen Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 aus *Archaea* dar, für die eine Rolle während der alternativen Häm-Biosynthese postuliert worden war (Storbeck *et al.*, 2010 und Kapitel 1). Allerdings waren diese archaeellen Enzyme noch nicht funktionell charakterisiert. Daher bestand das erste Ziel dieser Arbeit darin, die Funktionen der Proteine Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 aus *Methanosarcina barkeri* während der alternativen Häm-Biosynthese zu etablieren.

3.1 *In-vivo*-Enzymtest von Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2

Um zu prüfen welche Reaktionsschritte die Enzyme Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 ausgehend von Sirohäm als Substrat während der alternativen Häm-Biosynthese katalysieren, wurde ein *in-vivo*-Enzymtest durchgeführt. Hierbei wurden die Gene *ahb-nirD*, *ahb-nirH*, *ahb-nirJ1* und *ahb-nirJ2* aus *Methanosarcina barkeri* Codon-optimiert (für *E. coli*) in verschiedenen Kombinationen anaerob in *E. coli* BL21(DE3) unter gleichzeitiger Produktion von CysG aus *Salmonella typhimurium* exprimiert (2.4.10). Die homologen Gene *nirDLGHJEN* aus dem *nir*-Operon von *P. aeruginosa* wurden als Vergleich unter ebenfalls zeitgleicher Produktion von CysG exprimiert. CysG diente hierbei als trifunktionales Enzym, welches dazu genutzt wurde um genügend Sirohäm (SH) als Ausgangssubstrat für den *in-vivo*-Enzymtest anzureichern. Nach der Co-Produktion von CysG mit den Ahb-Nir-Proteinen bzw. den Nir-Proteinen wurde der zellfreie Extrakt der jeweils aufgeschlossenen Zellpellets zur Identifizierung der darin befindlichen Tetrapyrrole mittels entsprechender HPLC-Methode gemäß der Beschreibung im Material und Methodenteil analysiert.

3.1.1 Identifizierung der Funktion von Ahb-NirD und Ahb-NirH

In *E. coli*-Zellen, in denen CysG heterolog produziert wurde, konnte eine erfolgreiche SH-Produktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.1 (a), oben), welches als Ausgangssubstrat für den *in-vivo*-Enzymtest benötigt wurde. Da bereits bekannt war, dass die Proteine NirD, NirL, NirG und NirH zusammen die Decarboxylierung von Sirohäm zu 12,18-Didecarboxysirohäm (DDSH) während der Häm_{d1}-Biosynthese katalysieren, wurde zunächst getestet, ob sich diese Aktivität für die Proteine NirDLGH aus *P. aeruginosa* mittels unserem *in-vivo*-Enzymtest nachweisen ließ und ob somit dieser Test auch für die archaellen Proteine geeignet war.

In der Tat wiesen *E. coli*-Zellen, in denen CysG und NirDLGH sowie NirJ, NirE und NirN produziert wurden, DDSH auf, welches aus SH generiert wurde (Abbildung 3.1 (a), Mitte). Anschließend wurden Ahb-NirD und Ahb-NirH aus *M. barkeri* rekombinant in *E. coli* gemeinsam mit CysG produziert. Dabei konnte ebenfalls DDSH detektiert werden, jedoch in geringeren Mengen als in Anwesenheit von NirDLGH (Abbildung 3.1 (a), unten).

In den vorangehend beschriebenen Experimenten waren SH und DDSH aufgrund ihrer Retentionszeit und ihres UV/Vis-Absorptionsspektrums den entsprechenden Peaks zugeordnet worden. Um zu bestätigen, dass es sich bei beiden Tetrapyrrolen um SH und DDSH handelte, wurden die Versuche erneut durchgeführt und die Massenspektren der Substanzen im Anschluss an die HPLC mittels ESI-MS durch Alexander Neumann im Institut für Organische Chemie ermittelt. Bei den Messungen wurde für das isolierte SH eine Masse von 912,32 *m/z* detektiert (Abbildung 3.1 (b), oben). Theoretisch müsste SH allerdings eine Masse von 916,21 *m/z* aufweisen. Diese Diskrepanz ist durch die Bildung von γ -Lactonringen unter aeroben Bedingungen an den Pyrrolringen A und B durch die Acetatgruppen an den Positionen C2 und C7 zu erklären, wodurch eine theoretische Masse von 912,18 *m/z* für ein SH-Dilacton resultiert, was im Einklang mit der experimentell bestimmten Masse für SH steht. Die gleiche Beobachtung wurde auch für das DDSH, welches eine theoretische Masse von 828,23 *m/z* aufweist, gemacht. Die experimentell gemessene Masse von 824,36 *m/z* entspricht auch hier dem DDSH-Dilacton (Abbildung 3.1 (b), unten).

In der Tat ist die oxidative Lactam- und Lactonbildung für z.B. Sirohydrochlorin bereits seit Längerem bekannt (Battersby *et al.*, 1977). Die Tetrapyrrole SH und DDSH konnten demnach erfolgreich als angereicherte Tetrapyrrole in den entsprechenden *E. coli*-Zellen identifiziert werden. Es konnte also gezeigt werden, dass die beiden Proteine Ahb-NirD und Ahb-NirH aus *M. barkeri* analog zu NirDLGH aus *P. aeruginosa* als SH-Decarboxylase agieren, was

auch für AhbA und AhbB aus *Desulfovibrio vulgaris* und NirDLGH aus *Paracoccus pantotrophus* gilt (Bali *et al.*, 2011).

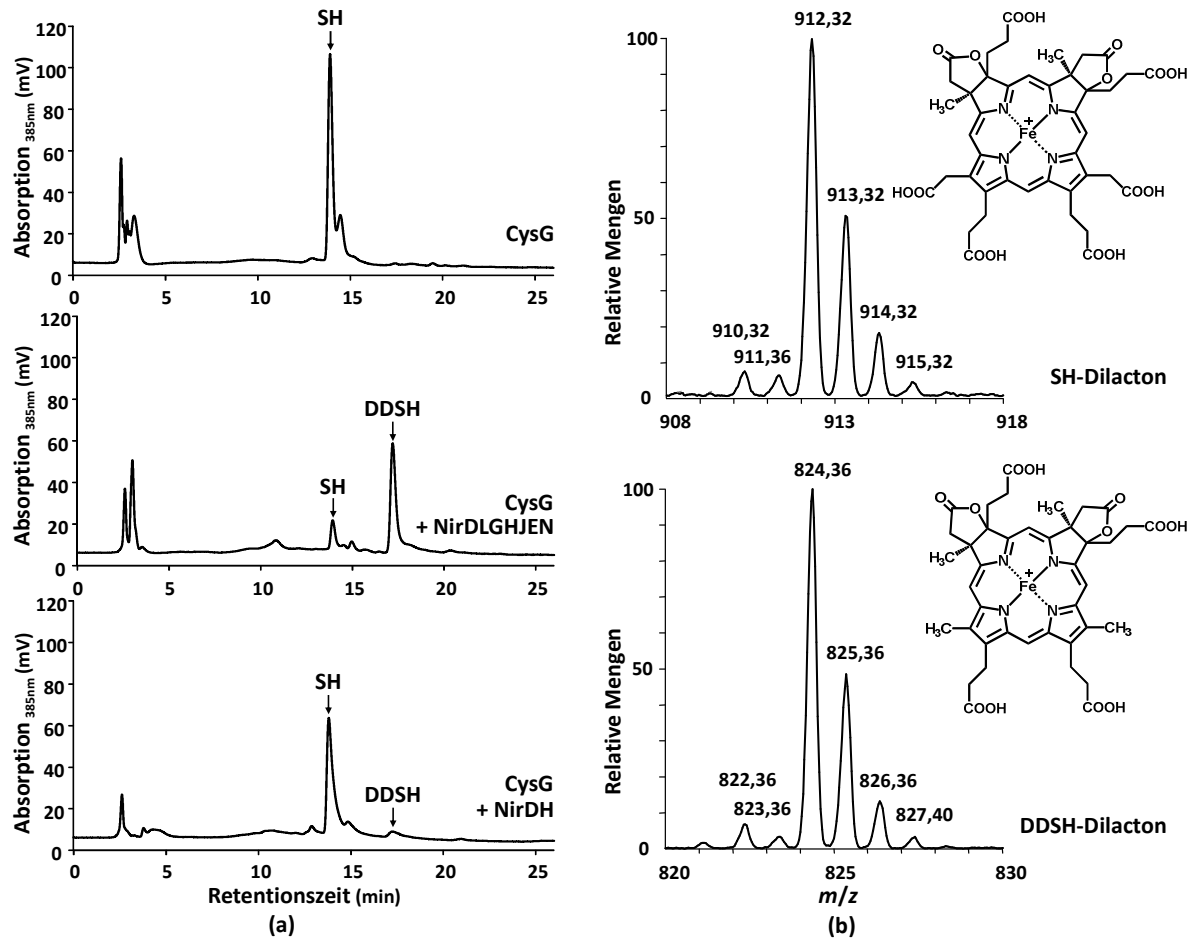


Abbildung 3.1: Funktion der Proteine Ahb-NirD und Ahb-NirH. (a): Identifizierung der Tetrapyrrole aus *in-vivo*-Enzymtests mit Ahb-NirD und Ahb-NirH aus *M. barkeri* sowie NirDLGHJEN aus *P. aeruginosa*. Die HPLC-Analyse des zellfreien Extrakts aus CysG-produzierenden *E. coli*-Zellen (oberes Chromatogramm) zeigt eine Anreicherung von Sirohäm (SH). Bei gleichzeitiger Produktion von NirDLGHJEN (mittleres Chromatogramm) ist entstandenes 12,18-Didecarboxysirohäm (DDSH) zu erkennen, was auch bei einer Co-Produktion mit Ahb-NirD und Ahb-NirH (unteres Chromatogramm) zu erkennen ist. Die Chromatogramme wurden aufgezeichnet durch Messung der Absorption bei 385 nm. (b): Massenspektrum von SH und die Struktur des identifizierten SH-Dilactons (oben) sowie von DDSH und die Struktur des identifizierten DDSH-Dilactons (unten) nach HPLC-Auftrennung. Die dargestellten Strukturen zeigen jeweils das $[M+H]^+$ -Ion. Es wurde im positiven Modus gemessen.

3.1.2 Identifizierung der Funktionen von Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2

Durch ihre hohe Sequenzhomologie untereinander war für die Proteine Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 die jeweilige potentielle Funktion nicht vorhersagbar. Daher wurde auch für diese beiden Enzyme der *in-vivo*-Aktivitätstest durchgeführt. Zur Herstellung des Substrats DDSH wurde CysG zusammen mit Ahb-NirD und Ahb-NirH produziert. Zusätzlich wurden entweder beide, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2, oder jeweils eines der beiden mit CysG und Ahb-NirD und Ahb-NirH im gleichen *E. coli*-Stamm produziert.

E. coli-Zellen, in denen zunächst CysG, Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 produziert wurden, wiesen eine Anhäufung von Fe-Copro III in den Zellen auf (Abbildung 3.2, oben), was durch eine vergleichende Analyse eines Fe-Copro III-Standards ermittelt wurde (Abbildung 3.2, unten). Eines der beiden Proteine, Ahb-NirJ1 oder Ahb-NirJ2, war demnach in der Lage die Umsetzung von Fe-Copro III aus DDSH zu katalysieren.

Wurden CysG, Ahb-NirD, Ahb-NirH sowie Ahb-NirJ1 in den Zellen produziert, so wurde kein Fe-Copro III detektiert, wohingegen bei gleichzeitiger Produktion von CysG, Ahb-NirD, Ahb-NirH und Ahb-NirJ2 Fe-Copro III nachgewiesen wurde (Abbildung 3.2, Mitte). Demnach wurde Ahb-NirJ2 erfolgreich als DDSH-Deacetylase identifiziert, welches das homologe Protein zu AhbC aus Sulfat-reduzierenden Bakterien darstellt (Bali *et al.*, 2011). Auffällig war, dass das angereicherte Fe-Copro III in der Zelle bei alleiniger Expression von *ahb-nirJ2* in geringeren Mengen vorlag als bei der Expression von *ahb-nirJ2* in Kombination mit *ahb-nirJ1*. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das Fe-Copro III nach seiner Synthese durch Ahb-NirJ2 direkt von Ahb-NirJ1 gebunden und so vor einem potentiellen Abbau innerhalb der Zelle geschützt wird.

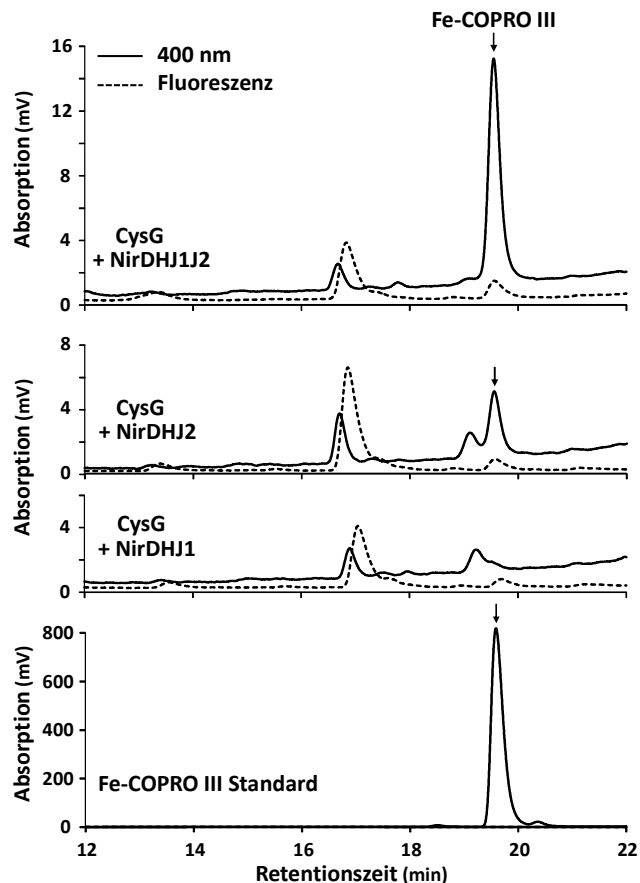


Abbildung 3.2: Funktion der Proteine Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2. Identifizierung der Tetrapyrrole aus *in-vivo*-Enzymtests von Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 aus *M. barkeri*. Die HPLC-Analyse des zellfreien Extrakts aus *E. coli*-Zellen, die CysG, Ahb-NirD, Ahb-NirH sowie Ahb-NirJ1 und Ahb-NirJ2 produzierten (oberes Chromatogramm) zeigte eine deutliche Fe-Copro III-Anhäufung, was durch einen Vergleich mit einem Fe-Copro III-Standard (unteres Chromatogramm) bestätigt wurde. Zellen, die nur Ahb-NirJ2 produzierten, wiesen ebenfalls Produktion von Fe-Copro III auf, wohingegen bei Produktion von Ahb-NirJ1 kein Fe-Copro III zu detektieren war (mittlere Chromatogramme). Die Chromatogramme wurden aufgezeichnet durch Messung der Absorption bei 400 nm (durchgängige Linie) und der Fluoreszenz (Anregung bei 409 nm, Emission bei 630 nm, gestrichelte Linie).

Da Ahb-NirJ2 als DDSH-Deacetylase identifiziert worden war, musste Ahb-NirJ1 die Umsetzung von Fe-Copro III zu Häm katalysieren. Dies konnte allerdings nicht durch den *in-vivo*-Enzymtest nachgewiesen werden, da auch *E. coli*-Zellen Häm produzieren, wobei dies über den klassischen Syntheseweg geschieht. Daher sollte ein *in-vitro*-Enzymtest für Ahb-NirJ1 etabliert werden, der in Kapitel 3.3.3 näher beschrieben wird.

Die bisher beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass es sich bei den Proteinen Ahb-NirD, Ahb-NirH, Ahb-NirJ2 und Ahb-NirJ1 aus *M. barkeri* tatsächlich um Homologe der Enzyme AhbA, AhbB, AhbC und AhbD aus Sulfat-reduzierenden Bakterien handelt. Daher werden ab hier auch die Enzyme aus *M. barkeri* mit AhbA, AhbB, AhbC und AhbD benannt.

3.2 *In-vitro*-Charakterisierung von AhbA und AhbB aus *M. barkeri*

3.2.1 Reinigung von AhbA und AhbB

Die aus den Proteinen AhbA und AhbB bestehende SH-Decarboxylase sollte *in vitro* charakterisiert werden. In einigen methanogenen *Archaea* sind die beiden Gene *ahbA* und *ahbB* fusioniert vorzufinden (Storbeck *et al.*, 2010) oder liegen wie in *M. barkeri* direkt aufeinanderfolgend im Genom vor (1.3.1). Da eine Fusion aus beiden Genen nicht nur auf eine gemeinsame Funktion sondern sogar auf eine mögliche Interaktion beider Proteine *in vivo* sprechen könnte, sollten beide Enzyme AhbA und AhbB gemeinsam produziert und gereinigt werden. Daher wurden zur genaueren Charakterisierung der Enzyme AhbA und AhbB aus *M. barkeri* die für beide Proteine codierenden Gene, *ahbA* und *ahbB*, in *E. coli*-Zellen gemeinsam exprimiert. Die rekombinante Produktion von AhbA und AhbB erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3) unter der Verwendung des Plasmids pETDuetnirDH (2.4.11). Dabei wurde AhbA als Fusionsprotein mit einem N-terminalen His-Tag produziert und AhbB in seiner nativen Form. Dadurch sollte eine potentielle Interaktion beider Enzyme durch eine gemeinsame Isolierung über eine Ni-NTA-Säule nachgewiesen werden (2.4.2).

Bei der Elution des AhbA durch Imidazol zeigte sich, dass sich in Fraktionen mit AhbA auch zu gleichen Teilen AhbB befand, obwohl dieses ohne fusionierten His-Tag vorlag. Das heißt, AhbA und AhbB konnten erfolgreich co-gereinigt werden (Abbildung 3.3). Dies lässt den Schluss zu, dass AhbA und AhbB aus *M. barkeri* nicht nur miteinander interagieren, sondern *in vivo* als Heterodimer eine funktionelle Einheit bilden um Sirohäm zu DDSH umzusetzen (3.1.1). Eine analytische Gelpermeationschromatographie (2.4.7) des gereinigten Proteinkomplexes bestätigte die AhbAB-Heterodimerbildung, da beide Proteine gemeinsam bei einem Retentionsvolumen von 15,7 mL eluierten, was einem 45 kDa-großen Komplex entsprach. Die einzelnen Proteine besitzen eine molekulare Masse von 20,9 kDa und 17,4 kDa (Beispielhaft Abbildung 3.4, (a)). Für AhbA und AhbB aus *Desulfovibrio desulfuricans* und *D. vulgaris* wurde später ebenfalls eine Heterodimerbildung nachgewiesen (Palmer *et al.*, 2014). Auch für die homologen Proteine NirDLGH aus denitrifizierenden Bakterien wird eine Interaktion angenommen, indem sie einen heterotetrameren Komplex bilden. Diese These wird dadurch untermauert, dass wie AhbA und AhbB auch NirDL aus

z.B. *Paracoccus pantotrophus*, *P. denitrificans* oder *Hydrogenobacter thermophilus* fusioniert im Genom vorliegen (Bali *et al.*, 2011; Haufschildt *et al.*, 2014).

Auf Grund ihres Auftretens als Heterodimer, werden im Folgenden beide Proteine als AhbAB-Komplex beschrieben und nicht mehr einzeln als AhbA und AhbB. Der gereinigte Komplex wurde bei -20 °C gelagert.

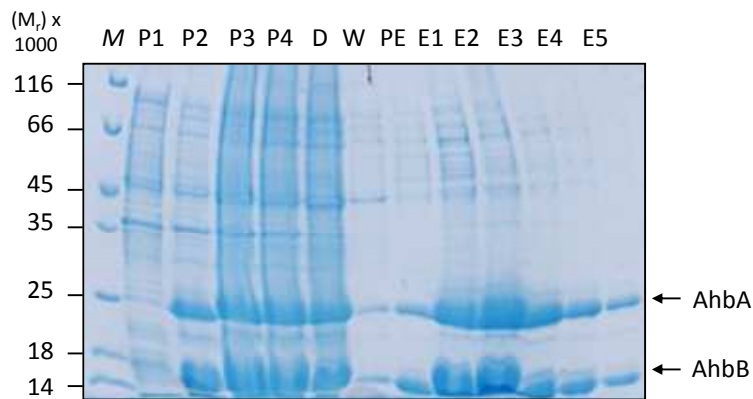


Abbildung 3.3: SDS-PAGE-Analyse der AhbAB-Reinigung über IMAC (Ni-NTA Agarose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der einzelnen Produktions- und Reinigungsschritte. AhbA mit einer relativen molekularen Masse von 20.900 und AhbB mit 17.400 sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. (M): Unstained Protein MW Marker; (P1): Proteine aus 1 mL Zellkultur vI; (P2): Proteine aus 1 mL Zellkultur nI; (P3): Proteine des zellfreien Extrakts nach FP; (P4): Lösliche Proteine nach UZ; (D): Proteine im Säulen-Durchlauf; (W): Proteine in der Wasch-Fraktion; (PE): Proteine in der Prä-Elutionsfraktion; (E1): Proteine der Elutionsfraktion 1 von 1,5 mL; (E2-E5): Proteine der Elutionsfraktionen 2-5 von je 750 µL.

3.2.2 Gereinigtes AhbAB enthält ein gebundenes Häm

Die Elutionsfraktionen von AhbAB, darunter vor allem die erste Fraktion, wiesen überraschender Weise eine rötliche Färbung auf, die auch während der GPC durch eine Absorption des Proteins bei 420 nm zu erkennen war. Diese Beobachtung deutete auf ein gebundenes Chromophor hin. Um zunächst die Bindung des Chromophors zu untersuchen wurde eine Dialyse durchgeführt, welche das Chromophor vom Proteinkomplex trennen sollte (2.4.20). Die Bindung erwies sich als relativ stark, sodass auch durch die Dialyse das Chromophor nicht von AhbAB getrennt werden konnte (Abbildung 3.4, (a)). Die genauere Charakterisierung des Chromophors erfolgte im Anschluss durch UV/Vis-Spektroskopie (2.4.13), bei der die unbehandelte, oxidierte Form sowie die mit Dithionit reduzierte Form des Chromophors innerhalb des Proteinkomplexes AhbAB analysiert wurde. Das dabei entstandene UV/Vis-Spektrum mit Absorptionsmaxima im oxidierten Zustand bei 423, 539 und 571 nm sowie im reduzierten Zustand bei 426, 530 und 559 nm ähnelte den Spektren von Häm in einem Proteinkomplex (Abbildung 3.4, (b)). Um zu bestätigen, dass es sich bei dem gebundenen Chromophor um Häm handelte, wurde es unter denaturierenden Bedingungen aus dem Heterodimer AhbAB extrahiert und mittels HPLC analysiert (2.4.20). Aufgrund der

identischen Retentionszeit von Häm aus einer Hemin-Standardlösung und des extrahierten Chromophors konnte das in AhbAB gebundene Chromophor als Häm identifiziert werden (Abbildung 3.4, (c)).

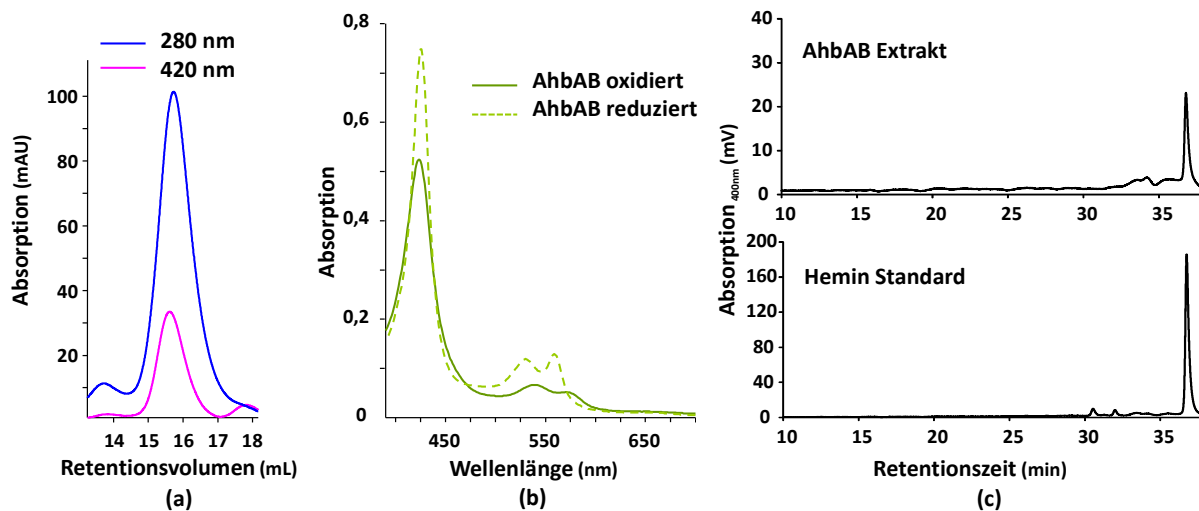


Abbildung 3.4: Charakterisierung des in AhbAB gebundenen Chromophors. (a) Chromatogramm der analytischen GPC des heterodimeren Komplexes AhbAB mit gebundenem Chromophor nach der Dialyse. Die Chromatogramme wurden aufgezeichnet durch Absorptionsmessung bei 280 nm und 420 nm. (b) UV/Vis-Spektrum des oxidierten und reduzierten AhbAB mit gebundenem Chromophor. (c) HPLC-Analyse des extrahierten Chromophors (oberes Chromatogramm) im Vergleich zur Analyse eines Hemin-Standards (unteres Chromatogramm).

Für das nichtkovalent, aber doch fest gebundene Häm, das in AhbAB-Proteinkomplexen auftritt, ergeben sich verschiedene potentielle Funktionen. Die Rolle des Häms als potentieller Cofaktor des AhbAB ist hierbei unwahrscheinlich, da er in seiner eigenen Biosynthese involviert wäre und bei Häm-Mangel die Synthese des Häms gehemmt wäre. Ebenfalls ist eine direkte Involvierung des Häms als Cofaktor auszuschließen, da beim homologen Komplex aus NirDLGH, der die gleiche Reaktion katalysiert, nach der Reinigung kein gebundenes Häm nachzuweisen ist und somit auch für die Proteinaktivität nicht nötig ist (Haufschildt *et al.*, 2014).

Die naheliegendste Funktion des gebundenen Häms in AhbAB war also, dass das gebundene Häm als Endprodukt-Inhibitor agiert. Für diese Rolle wären drei mögliche Mechanismen denkbar, die auch in Kombination auftreten könnten. (I) Durch eine direkte Beeinflussung der katalytischen Aktivität von AhbAB wäre nur das Häm-freie Heterodimer als SH-Decarboxylase aktiv, sodass letztendlich eine erfolgreiche Häm-Synthese stattfinden kann. Im Gegensatz hierzu wäre der Häm-gebundene AhbAB-Komplex funktionell inhibiert. Bei einem Häm-Mangel innerhalb des Organismus würde in diesem Fall Häm synthetisiert werden, bis wieder ausreichend Häm zur Verfügung stünde. (II) Häm könnte auch die Proteinstabilität von AhbAB beeinflussen, indem seine Bindung das Enzym anfälliger für einen

proteolytischen Verdau macht, was ebenfalls zu einer verminderten Häm-Biosynthese führen würde. (III) Eine dritte Möglichkeit wäre, dass AhbAB die Expression der Häm-Biosynthese-Gene direkt oder indirekt regulieren könnte, was dann über gebundenes Häm gesteuert würde.

Auch die Glutamyl-tRNA-Reduktase (HemA^B) wird in einigen Fällen wie AhbAB mit nichtkovalent gebundenem Häm gereinigt (Jones & Elliott, 2010; Srivastava & Beale, 2005). In diesem Fall scheint die Häm-Bindung an das Protein den proteolytischen Verdau zu begünstigen und zudem eine direkte Inhibierung der Enzymaktivität hervorzurufen, was als negative *feedback*-Inhibierung der Häm-Biosynthese dient (de Armas-Ricard *et al.*, 2011; L. Wang *et al.*, 1999). In der Tat weist auch die eukaryotische 5-Aminolävulinsäure-Synthase in Mitochondrien (HemA^A) eine solche *feedback*-Inhibierung auf, indem auch hier die Proteinstabilität von einer Häm-Bindung negativ beeinflusst wird (Yoshino *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte in Zellkulturen unter Zugabe von Häm eine Verminderung der Gen-Expression sowie eine erhöhte Degradierung der mRNA für ALAS festgestellt werden (J. Zheng *et al.*, 2008a).

3.2.3 *In-vitro*-Enzymtest für AhbAB

Um einen möglichen direkten Einfluss des gebundenen Häms auf die Aktivität von AhbAB genauer zu untersuchen, wurde unter Zugabe von verschiedenen Hemin-Konzentrationen ein anaerober *in-vitro*-Enzymtest durchgeführt, der von Kristin Haufschildt am Institut für Mikrobiologie etabliert wurde (2.4.17). Der Enzymtest wurde anaerob durchgeführt, da das Substrat Sirohäm zur Ausbildung von Lactonringen unter aeroben Bedingungen neigt (3.1.1) und dann nicht mehr decarboxyliert werden kann (Haufschildt *et al.*, 2014). Sirohäm wurde in *E. coli*-Zellen synthetisiert, die zur Produktion von CysG aus *Salmonella typhimurium* das Plasmid pBCM_cysG6 enthielten. Jeweils 75 µL des resultierenden, SH-enthaltenden zellfreien Extrakts wurden mit 20 µM gereinigtem AhbAB versetzt, welches zuvor mit diversen Konzentrationen an Hemin inkubiert wurde. Nach einer Inkubationszeit von 19 h wurden die in den Proben befindlichen Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Die Anhäufung von Sirohäm im Zellextrakt sowie dessen Umsetzung zu DDSH durch die Zugabe von gereinigtem AhbAB konnte erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 (a), obere Chromatogramme). Eine vorherige Inkubation von AhbAB mit 5 µM oder 20 µM Hemin unter denselben Testbedingungen hatte keinen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität des AhbAB *in vitro*, da im Vergleich zum Ansatz mit AhbAB ohne Hemin-Zugabe immer noch vergleichbare Mengen an DDSH produziert wurden (Abbildung 3.5 (a), untere Chromatogramme).

Um zu testen ob die gereinigten AhbAB-Komplexe bereits vollständig mit gebundenem Häm vorlagen und die resultierende Umsetzung in allen Testansätzen der des möglicherweise inhibierten Proteinkomplexes entsprach, wurden UV/Vis-Spektren des gereinigten AhbAB sowie von AhbAB mit zugefügtem Hemin aufgenommen. Freies Häm bzw. Hemin besitzt eine Soret-Bande bei ca. 389 nm, welche bei Protein-Bindung in den roten Wellenlängenbereich zu 420 nm verschoben wird (Pato *et al.*, 2004; Qi *et al.*, 1999). Durch diese Verschiebung lässt sich anhand der UV/Vis-Spektren erkennen ob AhbAB das zugefügte Hemin binden konnte oder ob der Proteinkomplex bereits gesättigt vorlag.

In der Tat zeigte sich bei AhbAB, welches mit 20 µM Hemin angereichert worden war, ein Anstieg in der Absorption bei 420 nm (Abbildung 3.5 (b)) und verdeutlichte, dass die Häm-Bindekapazität der gereinigten AhbAB-Komplexe noch nicht vollkommen ausgeschöpft war. Das Verhältnis von Häm zu den gereinigten AhbAB-Komplexen wurde nach einer HPLC-Analyse durch Integration des Häm-Peaks mit einer Hemin-Standardlösung

abgeschätzt. Es wurde ein Verhältnis von ca. 0,03 mol Häm pro mol gereinigtem AhbAB bestimmt, was eine unvollständige Besetzung des AhbAB-Komplexes mit Häm bestätigte. Durch die beschriebenen Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine direkte Inhibierung von AhbAB durch das gebundene Häm ausgeschlossen werden kann. Gereinigtes AhbAB lag zuvor bereits zum Teil mit gebundenem Häm vor, jedoch hätte im Fall einer direkten Enzyminhibierung durch Häm spätestens bei Zugabe von 20 μM Hemin eine deutliche Abnahme des entstandenen DDSH auftreten müssen, was nicht der Fall war.

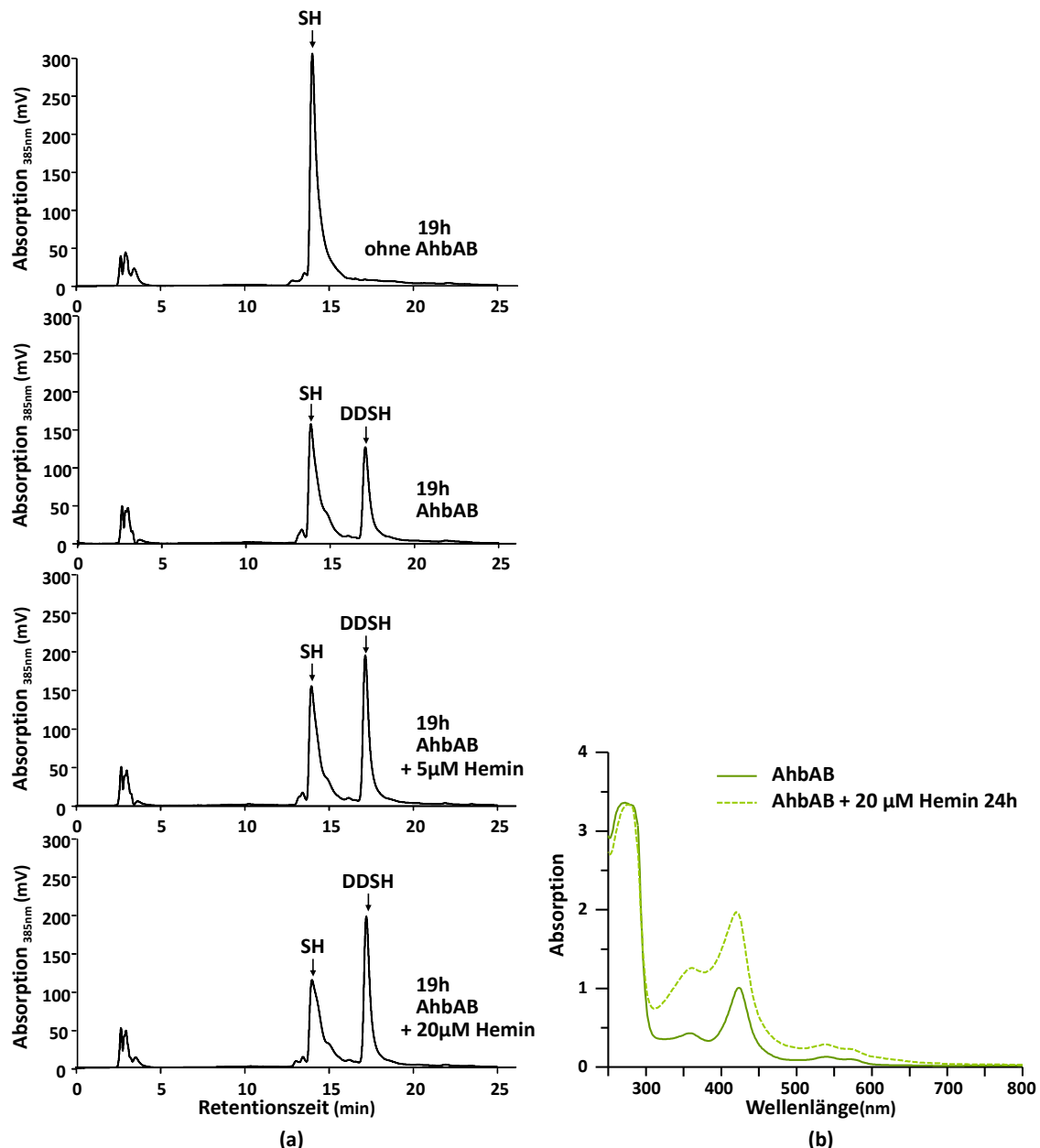


Abbildung 3.5: Einfluss von Häm auf die Aktivität von AhbAB. (a) HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbAB mit zellfreien Extrakt aus *E. coli*, welcher *cysG* überexprimiert. Analyse der Tetrapyrrole des Zellextrakts alleine (oberes Chromatogramm) sowie mit Zusatz von 20 μM gereinigtem AhbAB unter vorheriger Zugabe von 0 μM , 5 μM oder 20 μM Hemin (untere Chromatogramme). (b) UV/Vis-Spektren von AhbAB mit gebundenem Häm. Die Spektren zeigen 110 μM gereinigtes AhbAB, welches Häm aus *E. coli* gebunden hat, im Vergleich mit AhbAB, welches 24 h mit 20 μM zugesetztem Hemin inkubiert wurde.

Wie bereits erwähnt ist die Synthese von ALA durch die GluTR oder die ALAS ein direkter Angriffspunkt für einen *feedback*-Mechanismus zur Regulation der Häm-Biosynthese. Die Funktion des AhbAB als Angriffspunkt durch Enzym-Inhibierung für eine *feedback*-Regulation in der alternativen Häm-Biosynthese kann zwar ausgeschlossen werden, jedoch wäre ein Regulationsmechanismus der alternativen Häm-Synthese an diesem wichtigen Reaktionsschritt sinnvoll, da die Synthese des Sirohäms als eigenständige prosthetische Gruppe somit nicht beeinträchtigt wäre. Sowohl Sirohäm als auch alle folgenden Intermediate der alternativen Häm-Biosynthese haben bereits ein Eisenatom chelatiert und sind somit toxischer als die Vorläufer des klassischen Synthesewegs, in dem erst als letzter Schritt die Insertion des Eisenatoms in den Tetrapyrrolring erfolgt (1.2.2).

Freies Häm, welches als Eisen(III)-Komplex vorliegt, existiert innerhalb einer Zelle nur in geringen Mengen, da das Eisen wie andere divalente Metalle Sauerstoffradikale durch die Fenton-Reaktion generieren kann. Der genaue Mechanismus dieser Reaktion ist noch unklar, jedoch reagiert H_2O_2 mit Eisen, wodurch es zur Radikalbildung kommt (Dunford, 2002). Diese entstandenen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS), darunter Hydroxyl-Radikale und Sauerstoffradikale, sind wie ihr Name impliziert hoch reaktiv und dadurch in biologischen Zellen toxisch. Durch ROS kommt es zu oxidativem Stress in den Zellen und so zu Schädigungen der DNA, RNA, Proteine und Lipide (Cabiscol *et al.*, 2000). Eine Konzentration an freiem Häm von über $1\ \mu\text{M}$ führt zu diesem Phänomen, weshalb es wichtig ist, die Häm-Konzentration innerhalb der Zelle niedrig zu halten und seine Synthese sowie seinen Abbau zu regulieren (Sassa, 2004). Bei diesen hohen Konzentrationen wird der Häm-Abbau durch die Produktion der Häm-Oxygenase eingeleitet, wobei freies Häm in höheren Eukaryoten an den Transkriptionsfaktor Bach1 bindet, wodurch er von der DNA dissoziiert und nicht mehr die Genexpression reprimieren kann (Sun *et al.*, 2002). Bei Konzentrationen unter $0,1\ \mu\text{M}$ steuert das freie Häm seine Biosynthese durch die Regulation der Genexpression von *hemA* und dessen Produkt ALAS (3.2).

Zwar wird AhbAB nicht wie GluTR direkt von Häm in seiner Aktivität beeinflusst (3.2), jedoch ist anzunehmen, dass es ähnlich wie Bach1 die Genexpression im Häm-Biosynthese-Cluster regulieren könnte. Bei direktem Einfluss auf die Expression würde allerdings eine Häm-Bindung an den heterodimeren Komplex von AhbAB anders als bei Bach1 eine Bindung an die Promotor-Region und somit eine Repression auftreten. In Datenbanken (2.6) wird AhbAB in der Tat als Transkriptionsregulator der Lrp/AsnC-Familie aufgeführt. Namensgebende Vertreter dieser Familie sind Lrp (*leucine-responsive regulatory protein*) und

AsnC (*asparagine synthase C*) (Calvo & Matthews, 1994; Kölling & Lothar, 1985). Lrp aus *E. coli* reguliert hierbei häufig verschiedene metabolische Synthesewege, indem es bei einem Überfluss an Metaboliten (*feast*) die Gene für deren Synthese reprimiert und im Hungerzustand (*famine*) exprimiert. Daher wird auch häufiger der Begriff *feast/famine* regulatorische Proteine (FFRP) verwendet. Diese Familie von transkriptionell aktiven Proteinen ist bisher nur in Prokaryoten, in *Archaea* als auch in Bakterien, ausgemacht worden. Diese Proteine besitzen ein molekulares Gewicht von durchschnittlich 15 kDa und liegen als Oligomere vor (Brinkman *et al.*, 2003). Das alles sind Kriterien, die AhbAB ebenfalls erfüllt. Ähnlich des AsnC, welches abhängig vom Asparagin-Spiegel die Gene seiner eigenen Synthese und der eigentlichen Asparagin Synthase (*asnA*) autoreguliert, könnte auch AhbAB eine Autoregulation in Abhängigkeit vom Häm-Spiegel in der Zelle durchführen. Es ist auffällig, dass im Gegensatz zu AhbAB aus *M. barkeri* der homologe Komplex AhbAB aus *Desulfovibrio desulfuricans* nach der Reinigung keine Bindung von Häm aufweist, allerdings mit seinem Produkt DDSH isoliert werden konnte (Palmer *et al.*, 2014). Dies könnte auf ein Substratchanneling von AhbAB zu AhbC hindeuten um auf diesem Weg eine erhöhte Menge an freien Eisen-haltigen Tetrapyrrolen und damit die Bildung von ROS zu vermeiden.

2014 wurde die Struktur der homologen Proteine NirDL aus *Hydrogenobacter thermophilus* sowie die Struktur des AhbAB aus *Desulfovibrio desulfuricans* ermittelt (Haufschildt *et al.*, 2014; Palmer *et al.*, 2014). Es fanden sich die typischen Strukturen der Lrp/AsnC-Proteine wieder, welche aus einer N-terminalen Domäne aus drei α -Helices, darunter einem einfachen Helix-Turn-Helix-Motiv zur DNA-Bindung, und einem β -Faltblatt sowie einer C-terminalen Effektor-Bindedomäne (RAM-Domäne) bestehen (Thaw *et al.*, 2006). Beide Domänen sind über eine Linker-Region verbunden, innerhalb dieser AhbA im Vergleich zu AhbB eine zusätzliche Helix besitzt (Abbildung 3.6). Namensgebend für die RAM-Domäne war dessen generelle Beteiligung in der allosterischen Regulation des Aminosäuren-Metabolismus (*regulation of amino acid metabolism*) (Ettema *et al.*, 2002). Auch wenn AhbAB nicht im Aminosäure-Metabolismus involviert ist, so weist diese Region auch hier dennoch ein $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Motiv auf, welches für die Lrp/AsnC-Familie typisch ist und kleine Moleküle bindet, weshalb auch die Bezeichnung als RAM-Domäne beibehalten wird.

Die dreidimensionale Struktur von AhbAB deutet also tatsächlich auf eine mögliche regulatorische Funktion dieses Proteins zusätzlich zu seiner Enzymfunktion hin.

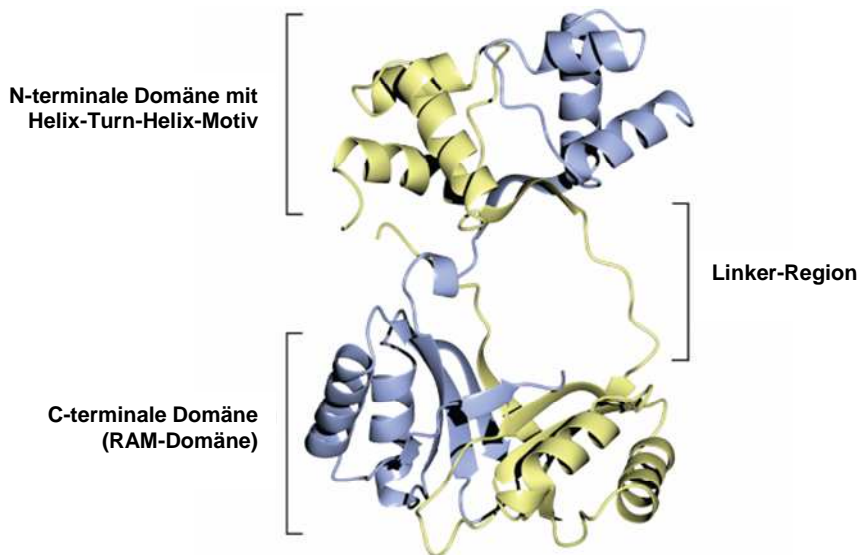


Abbildung 3.6: Struktur des Heterodimers AhbAB aus *D. desulfuricans*. Die typischen Domänen von Lrp/AsnC-Transkriptionsregulatoren sind auch bei AhbAB deutlich zu erkennen. (blau): AhbA; (gelb): AhbB. (nach Palmer *et al.*, 2014)

Erste Versuche zur DNA-Bindung wurden mit dem Protein NirL aus *Heliophilum fasciatum* durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass NirL an ein DNA-Fragment bindet, welches sich 200 bp *upstream* direkt vor *nirJ2* befand, wodurch für NirL sowie NirD eine regulatorische Funktion angenommen wurde (Xiong *et al.*, 2007).

Eventuell könnte auch für AhbAB aus *M. barkeri* eine DNA-Bindung an eine vor *ahbC* oder *ahbD* liegende Promotor-Region möglich sein. Auf Grund der Anordnung des Häm-Biosynthese-Clusters dieses Organismus (1.3.1), wäre die Regulation durch Promotor-Regionen vor beiden Genen möglich, wobei auch nur die Anwesenheit eines Häm-regulierenden Promotors vor *ahbD* denkbar wäre, da hierbei wie im Fall von *H. fasciatum* die Gene *ahbAB* direkt im Anschluss angrenzen.

Da zunächst das Protein AhbD der alternativen Häm-Biosynthese charakterisiert werden sollte, wurde hier auf weitere Protein-DNA-Bindungsexperimente mit AhbAB, ggf. auch unter verschiedenen Häm-Konzentrationen verzichtet. Diese Studien werden Gegenstand nachfolgender Arbeiten sein (siehe Ausblick).

3.3 *In-vitro*-Charakterisierung von AhbD aus *M. barkeri*

3.3.1 Anaerobe Reinigung von rekombinantem, nativem AhbD

Zur genaueren Charakterisierung des AhbD aus *M. barkeri* sollte dieses zunächst in seiner nativen Form gereinigt werden um einen potentiellen negativen Einfluss eines fusionierten Tags ausschließen zu können.

Die rekombinante Produktion erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3) unter der Verwendung des Plasmids pETDuetahbD (2.4.12). Die Zellen wurden unter anaeroben Bedingungen inkubiert bevor sie ebenfalls anaerob aufgeschlossen wurden (2.4.1). Alle weiteren Schritte erfolgten ausnahmslos unter anaeroben Bedingungen (2.2.2).

Der gewonnene zellfreie Extrakt wurde über eine 5 mL HiTrap™ Blue HP-Säule grob gereinigt (2.4.8). Die verwendete Säule besitzt eine Blue Sepharose Matrix, welche eine Vielzahl an Molekülen, darunter auch Proteine, welche Nukleotidcofaktoren besitzen, bindet. Da für AhbD die Zugehörigkeit zur Familie der RS-Enzyme (1.4) postuliert wird, sollte es in der Lage sein SAM zu binden und somit auch mit der Matrix eine Wechselwirkung einzugehen, welche durch einen linearen Salzgradienten wieder aufgehoben werden kann.

Proben der gesammelten 1 mL-Fractionen nach diesem ersten Reinigungsschritt wurden über eine SDS-PAGE (2.4.3) analysiert, da anhand des Chromatogramms kein distinkter Peak von AhbD auszumachen war (Abbildung 3.7). AhbD eluierte in einem breiten Bereich von der Säule und war in den Fractionen 16-66 vorzufinden, wobei es erfolgreich von den meisten Zellproteinen getrennt werden konnte, die nicht mit der Matrix interagierten (Abbildung 3.8). Die AhbD-enthaltenden Fractionen 34-66 wurden vereinigt, da hier AhbD als dominierendes Protein vorlag. Es folgte eine Konzentrierung der Proteinlösung auf 5 mL, sodass vor einem folgenden zweiten Reinigungsschritt die Lösung durch einen Pufferwechsel entsalzt werden konnte und nun in einem Probenvolumen von 7 mL vorlag (2.4.4).

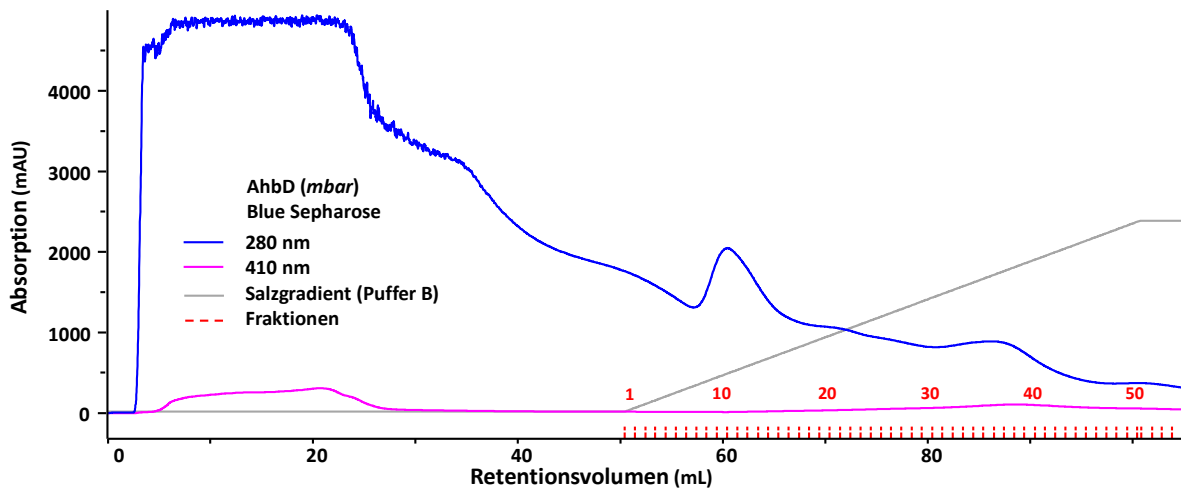


Abbildung 3.7: Chromatogramm der nativen AhbD-Proteinreinigung über Blue Sepharose am Äkta™ Purifier. AhbD eluierte bei erhöhter Salzkonzentration in einem breiten Bereich, der nur über SDS-PAGE-Analyse auszumachen war. In Grau ist der Salzgradient von 0 M NaCl (\triangleq 0 % Puffer B) bis 1 M NaCl (\triangleq 50 % Puffer B) schematisch dargestellt.

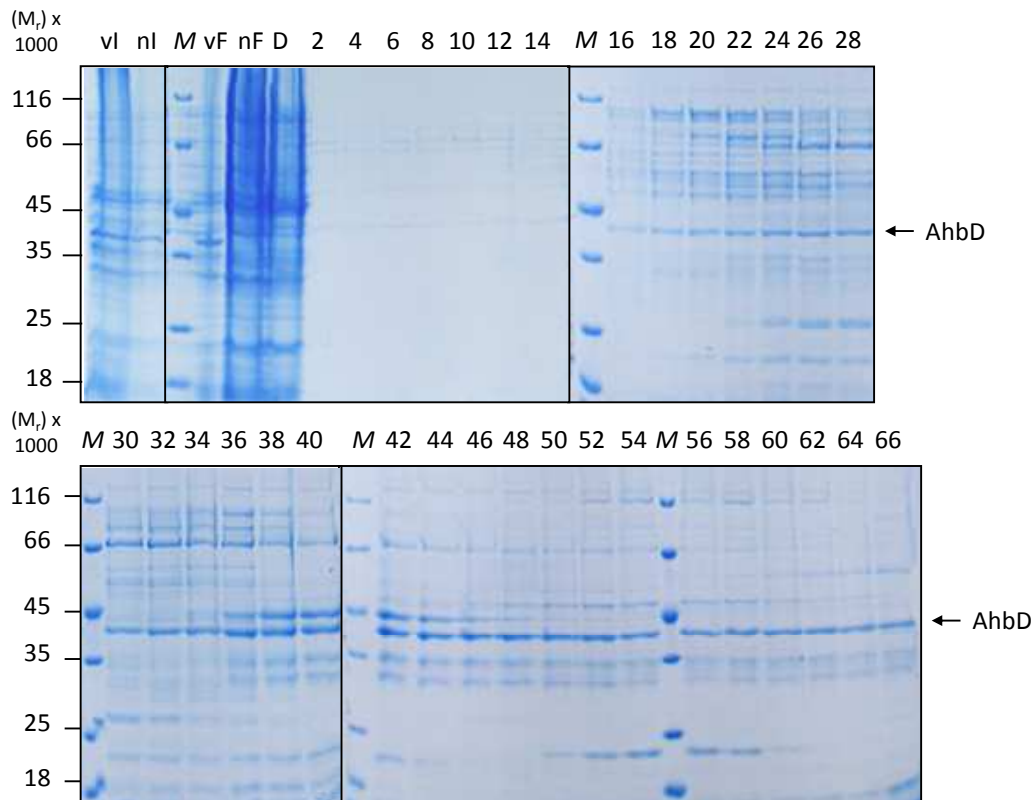


Abbildung 3.8: SDS-PAGE-Analyse von Proben des ersten Reinigungsschrittes von nativem AhbD (Blue Sepharose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind neben Proben der Produktionsschritte auch die korrespondierenden Proben der Fraktionen nach der Reinigung über die HiTrap™ Blue HP-Säule zur Ermittlung der Elution von AhbD. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (vl): Proteine vor Induktion; (nl): Proteine nach Induktion; (M): Unstained Protein MW Marker; (vF): Proteine des zellfreien Extrakts vor FP; (nF): Proteine des zellfreien Extrakts nach FP; (A): Proteine im Säulen-Auftrag; (2-66): Proteine der Fraktionen 2-66 von je 1 mL

Die umgepufferte, AhbD-haltige Proteinlösung wurde über eine 1 mL Mono Q™ 5/50 GL-Säule in einem zweiten Reinigungsschritt von restlichen Verunreinigungen getrennt (2.4.9).

Die hierbei verwendete Säule fungiert als starker Anionenaustauscher, welcher eine positiv geladene Matrix besitzt, die mit Proteinen über deren Ladung wechselwirkt. Eluiert werden die Proteine wie beim ersten Reinigungsschritt über die Blue Sepharose Matrix durch eine Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer, weshalb ein vorheriges Entfernen des Salzes aus der Proteinlösung durchgeführt werden musste. Die Chlorid-Ionen des hierbei verwendeten NaCl verdrängen bei höherer Konzentration die negativ geladenen Proteine abhängig ihrer Nettoladung von der Matrix.

Das resultierende Chromatogramm zeigte verschiedene Proteinpeaks mit einem distinkten Haupt-Peak, welcher in den Fraktionen 12-14 gesammelt wurde. Die Proteine dieses Peaks weisen eine Absorption bei 410 nm auf (Abbildung 3.9). Die gesammelten 1 mL-Fraktionen der Ionenaustausch-Chromatographie wurden zur Ermittlung des AhbD-Gehalts über eine SDS-PAGE (2.4.3) analysiert.

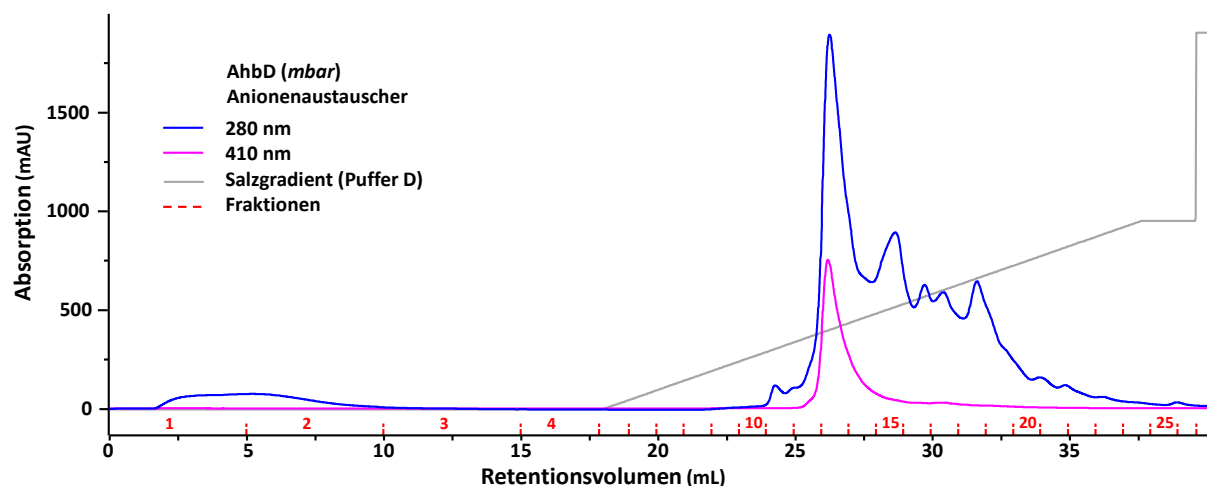


Abbildung 3.9: Chromatogramm der nativen AhbD-Proteinreinigung über Anionenaustauscher am Äkta™ Purifier. Es eluiert ein Protein mit distinktem Peak, welcher sowohl bei 280 nm als auch bei 410 nm eine Absorption aufweist. In Grau ist der Salzgradient von 0 M NaCl (\triangleq 0 % Puffer D) bis 0,5 M NaCl (\triangleq 50 % Puffer D) sowie der Übergang zur Reinigung der Säule mit 1 M NaCl (\triangleq 100 % Puffer D) schematisch dargestellt.

Die höchste Konzentration an AhbD konnte in der Fraktion 14 ausgemacht werden (Abbildung 3.10), womit im Chromatogramm der Haupt-Peak mit Absorptionen bei 280 nm und 410 nm als eluiertes AhbD identifiziert werden konnte. Auf Grund der Länge der Schläuche des Äkta™ Purifier Systems zum Fraktionssammler waren es nicht die Fraktionen 12-14 sondern die Fraktionen 13-15, die AhbD enthielten und vereinigt wurden.

Bis auf einige niedermolekulare Proteine konnte natives AhbD aus *E. coli*-Zellen erfolgreich gereinigt werden, wobei es unter den gegebenen Bedingungen in einem distinkten Peak bei einer NaCl-Konzentration von 200 mM von der MonoQ-Säule eluierte.

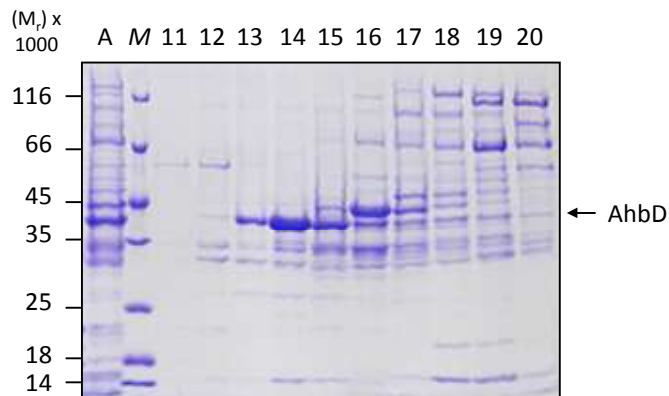


Abbildung 3.10: SDS-PAGE-Analyse des zweiten Reinigungsschrittes des nativen AhbD (MonoQ), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind die Proteine der korrespondierenden Fraktionen nach der Reinigung über die Mono Q™ 5/50 GL-Säule zur Ermittlung der AhbD-beinhaltenen Fraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (A): Proteine im Säulen-Auftrag; (M): Unstained Protein MW Marker; (11-20): Proteine der Fraktionen 11-20 von je 1 mL.

Das gereinigte AhbD wurde bei 4 °C in einer Anaerobenflasche zwischengelagert bevor damit erste Charakterisierungen durchgeführt wurden.

3.3.2 Bestimmung des Fe- und S-Gehalts von nativem AhbD

Wie bereits erwähnt wies das gereinigte AhbD im Chromatogramm des zweiten Reinigungsschrittes eine Absorption bei 410 nm auf. Diese Absorption ist anders als bei AhbAB nicht auf eine Häm-Bindung (3.2.2) sondern auf die Bindung von [Fe-S]-Clustern zurückzuführen, welche bei dieser Wellenlänge ebenfalls absorbieren. Da für AhbD eine Zugehörigkeit zur Familie der RS-Enzyme postuliert wurde (1.4) und diese mindestens ein [4Fe-4S]-Cluster besitzen, ist eine solche Clusterbindung nicht überraschend. Allerdings ist neben dem typischen Cystein-reichen Motiv am N-terminalen Ende des AhbD ein zweites am C-Terminus lokalisiert, welches ggf. die Liganden für ein weiteres [Fe-S]-Cluster zur Verfügung stellt. Für erste Untersuchungen zur [4Fe-4S]-Cluster-Bindung in AhbD wurde zunächst ein UV/Vis-Spektrum des gereinigten Proteins aufgenommen (2.4.13).

Es zeigte sich neben der typischen Proteinabsorption bei 280 nm zusätzlich eine breite Absorptionsschulter bei ca. 410 nm (Abbildung 3.11 (a)), welche ein Hinweis für ein gebundenes [4Fe-4S]-Cluster im Protein darstellt (Ugulava *et al.*, 2000). Im Falle eines gebundenen [2Fe-2S]-Clusters wären zusätzliche Maxima bei ~325 nm, ~420 nm sowie ein eindeutig zu identifizierendes Absorptionsmaximum bei 460 nm anzutreffen. Das weitere Maximum in der Proteinlösung bei ca. 328 nm deutet vermutlich auf das Vorhandensein eines solchen [2Fe-2S]-Clusters oder auf ein [3Fe-4S]-Cluster, welches als Abbauprodukt vorliegen könnte. Eine solche Degradation des Clusters kann z.B. dann auftreten, wenn das Cluster an

Sauerstoff exponiert wird oder wie vermutlich in diesem Fall nicht genügend Eisen- und Schwefelquellen während der rekombinanten Produktion in der Zelle zur Verfügung standen. Um intakte [Fe-S]-Cluster zu erhalten wurde eine chemische Rekonstitution durchgeführt, wobei Eisen- und Sulfidionen unter reduzierenden Bedingungen das Cluster im Protein wiederherstellen sollten (2.4.16).

Nach der Rekonstitution zeigte sich eine Intensivierung der typischen braunen Farbe von AhbD, welche durch die [Fe-S]-Clusterbindung auftritt. Auch im UV/Vis- Spektrum war eine Veränderung zu beobachten, da das Absorptionsmaximum bei 328 nm verschwunden war (Abbildung 3.11 (b)). Das native, rekonstituierte AhbD enthielt demnach wahrscheinlich ausschließlich [4Fe-4S]-Cluster.

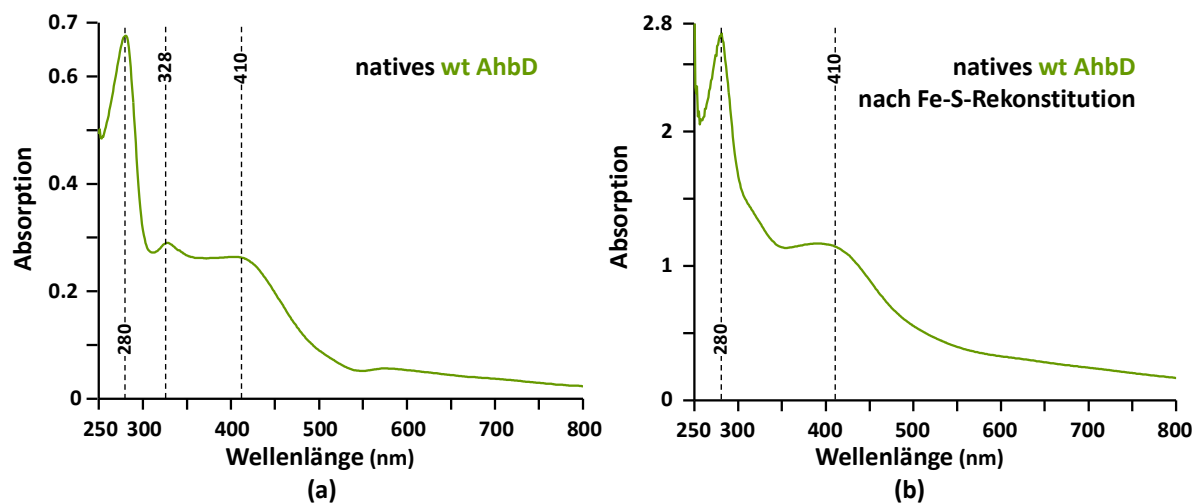


Abbildung 3.11: UV/Vis-Spektrum des nativen AhbD. (a) Anaerob gereinigtes AhbD weist deutliche Absorptionsmaxima bei 280 nm, 328 nm sowie eine Absorptionsschulter bei 410 nm auf, welche charakteristisch für [4Fe-4S]-Cluster ist (AhbD: 0,9 mg/mL). (b) Nach chemischer Eisen-Schwefel-Rekonstitution des Proteins zeigt sich, dass die Absorption bei 328 nm verschwunden ist (AhbD: 4 mg/mL). Küvettendicke: 10 mm, Blank: CD-Puffer.

Um die Anzahl der [4Fe-4S]-Cluster in AhbD zu ermitteln, wurde der Gehalt an Eisen und Schwefel in der Proteinlösung colorimetrisch bestimmt (2.4.15). Bei diesen Bestimmungsmethoden wurden jeweils durch die zeitgleiche Vermessung von Eichlösungen Kalibrierungsgeraden erstellt, anhand derer der Fe- und S^{2-} -Gehalt in der Proteinlösung ermittelt werden konnte (Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Für das native und rekonstituierte AhbD ergaben sich Werte von 8,5 mol Eisen und 5,1 mol Sulfid pro mol AhbD.

Zwar war der ermittelte Sulfid-Gehalt etwas niedriger als der ermittelte Eisen-Wert, jedoch implizierten diese Messwerte in Kombination mit den gemessenen UV/Vis-Spektren die Bindung von zwei [4Fe-4S]-Clustern.

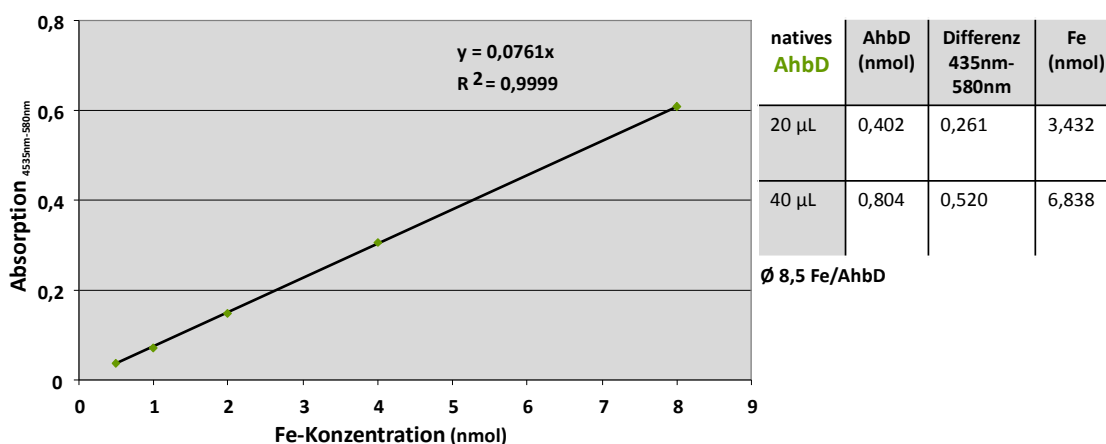


Abbildung 3.12: Kalibrierungsgerade zum Eisen-Bestimmungstest von nativem AhbD. Anhand der Geraden konnte eine Fe-Konzentration von 8,5 nmol pro nmol AhbD ermittelt werden (AhbD: 776,8 µg/mL). (grüne Rauten): Messpunkte der Fe-Eichlösungen.

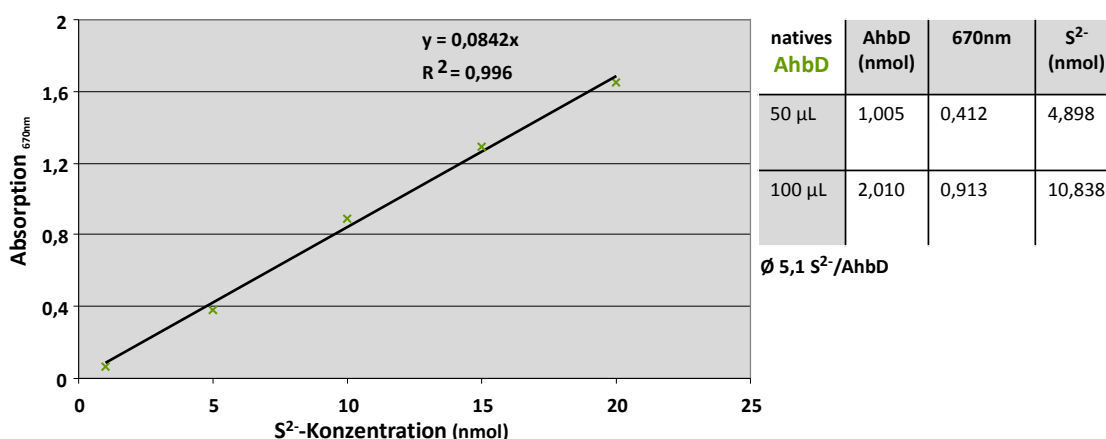


Abbildung 3.13: Kalibrierungsgerade zum Schwefel-Bestimmungstest von nativem AhbD. Anhand der Geraden konnte eine S²⁻-Konzentration von 5,1 nmol pro nmol AhbD ermittelt werden (AhbD: 776,8 µg/mL). (grüne Kreuze): Messpunkte der S²⁻-Eichlösungen.

Die RS-Enzyme der Häm d_1 - und Häm-Biosynthese aus *P. aeruginosa*, *E. coli*, *M. barkeri* sowie *D. vulgaris* weisen alle die für RS-Enzyme typische Bindungsstelle eines [4Fe-4S]-Clusters mit dem Motiv CxxxCxxC auf, wobei alle drei beteiligten Cysteine für die Koordinierung des Clusters benötigt werden (Abbildung 3.14 (a), 1.4). Ein direkter Sequenzvergleich von AhbD zu den homologen Proteinen AhbC aus *M. barkeri* sowie NirJ aus *P. aeruginosa* zeigt allerdings das Auftreten weiterer konservierter Cysteine, welche nahe des C-Terminus lokalisiert sind und auch in den AhbC- und AhbD-Enzymem aus *Desulfovibrio vulgaris* zu finden sind (Abbildung 3.14 (b)). Dieses zweite Cystein-reiche Motiv wird bei NirJ durch die Sequenz Cx₂Cx₅Cx₂₀C sowie bei beiden AhbC-Enzymen durch Cx₂Cx₅Cx₂₁C charakterisiert. Bei AhbD ist wie im Falle des NirJ das Motiv Cx₂Cx₅Cx₂₀C zu erkennen, jedoch fällt bei genauerer Betrachtung ein zusätzliches Cystein innerhalb dieser Sequenz auf, wodurch ein Cystein-Motiv aus fünf Cysteinen (Cx₂Cx₅Cx₂Cx₁₇C) gebildet

wird. Das bisher einzig bekannte RS-Enzym aus der klassischen Häm-Biosynthese, HemN, weist keinerlei solcher zusätzlichen Cysteine auf und kann demnach nur ein [4Fe-4S]-Cluster binden. Es ist bekannt, dass einige RS-Enzyme eine Variation des klassischen Bindemotivs des RS-Clusters (CxxxCxxC) aufweisen, jedoch konnte die Involvierung des C71 an der Clusterbindung in HemN ausgeschlossen werden (Layer *et al.*, 2002).

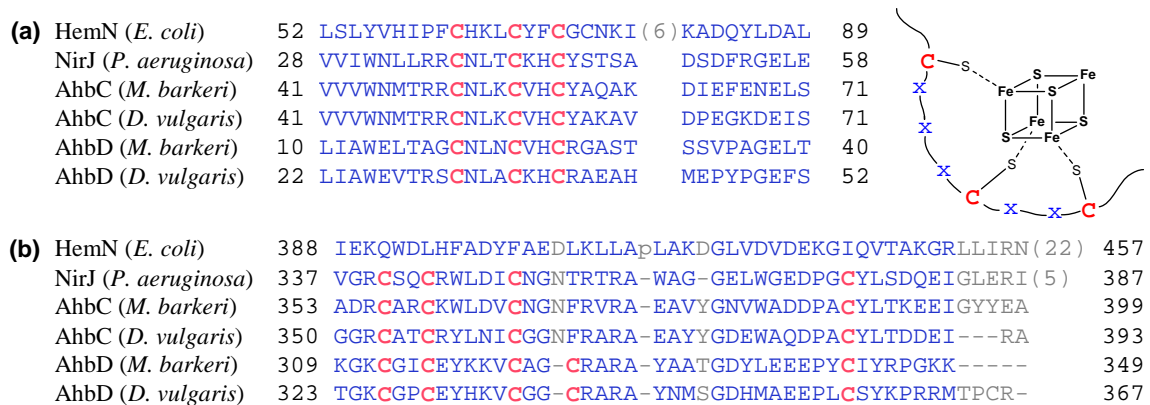


Abbildung 3.14: Aminosäure-Sequenzalignment der N-terminalen und C-terminalen Region verschiedener RS-Enzyme. Dargestellt sind die AS-Sequenzen der RS-Enzyme der Häm d_1 - und Häm-Biosynthese aus *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. barkeri* sowie *D. vulgaris*. (a) Die N-terminalen Regionen der jeweiligen Proteine mit dem typischen Cystein-reichen Motiv zur Bindung des RS-Clusters sowie (b) die C-terminalen Regionen mit ggf. potentiell involvierten Cysteinen zur Bindung eines zweiten zusätzlichen Clusters. (rot): Cysteine, (a) die in einer Clusterbindung involviert sind sowie (b) diejenigen, die involviert sein könnten; (blau): schwach konservierte AS; (grau): unspezifische AS.

Da die funktionelle Diversität der RS-Enzyme sehr groß ist, kann nur schwer durch die Zugehörigkeit zur Familie auf ein molekulares Ziel oder auf dessen Involvierung in einen bestimmten biologischen Prozess geschlossen werden. Durch bioinformatische Analysen wurden Subfamilien innerhalb der Radical SAM Familie ermittelt um sie etwas genauer kategorisieren zu können (Haft & Basu, 2011). Eine Reihe von RS-Enzymen ist dafür bekannt neben ihrem RS-Cluster ein zusätzliches [Fe-S]-Cluster in der Form eines [2Fe-2S]- oder eines [4Fe-4S]-Clusters zu binden, welches essentiell für die Aktivität des Proteins zu sein scheint (Lanz & Booker, 2012). Mitglieder der ermittelten Subfamilie TIGR04085 sind hierbei RS-Enzyme, welche durch eine zusätzliche C-terminale [4Fe-4S]-Cluster-Bindedomäne charakterisiert werden. Auf Grund der damals biochemisch bereits charakterisierten Mitglieder dieser Subfamilie wurden sie auch als SPASM für ihre Involvierung in der Maturation von Subtilosin (AlbA), PQQ (PqqE), anaeroben Sulfatasen (anSMEs) und Mycofactocin (MtfC) benannt (Haft & Basu, 2011). Eine sogenannte SPASM-Domäne wird in den Datenbanken auch für AhbD angegeben, was die Bindung eines weiteren

[4Fe-4S]-Cluster implizierte und durch die Bestimmung des Fe- und S-Gehaltes des Enzyms tatsächlich nahegelegt wurde.

Es sind auch Beispiele für mehrere zusätzliche [Fe-S]-Cluster innerhalb eines einzelnen RS-Enzyms bekannt wie im Fall des kürzlich kristallisierten anaeroben Sulfatase-Maturierungsenzyms aus *Clostridium perfringens* (anSMEcpe), welches zwei zusätzliche Cluster besitzt (Goldman *et al.*, 2013). An der Bindung dieser beiden zusätzlichen Cluster sind die Bindemotive Cx₅Cx₁₄C sowie Cx₂Cx₅Cx₃Cx₁₇C beteiligt, wobei das vorletzte Cystein der letzteren Sequenz in der Bindung des ersten Clusters involviert ist (Abbildung 3.15). Somit werden beide Cluster von jeweils vier Cysteinen koordiniert, was ihre Funktion als weiteres RS-Cluster ausschließt, da in beiden Fällen kein freies Eisenatom zur Bindung von SAM zur Verfügung steht. Das erste zusätzliche Cluster des anSMEcpe weist ein ähnliches Bindemotiv zu dem Bindemotiv des einzigen zusätzlichen Clusters in MoaA auf (Abbildung 3.15, grün unterlegt). Dieses wird allerdings nur durch drei Cystein-Reste koordiniert, sodass das freie Eisenatom des [4Fe-4S]-Clusters das Substrat 5'-GTP des MoaA binden kann (Hänzelmann & Schindelin, 2006).

Ein Vergleich von AhbD mit anSMEcpe zeigt jedoch, dass nicht nur MoaA ähnliche Motive wie anSMEcpe aufweist, sondern dass die Ähnlichkeit der Cystein-Motive von AhbD noch größer ist (Abbildung 3.15). Bei einem direkten Aminosäure-Sequenzalignment wird deutlich, dass nicht nur das Bindemotiv für ein Cluster sondern sogar weitere Cysteine in der AS-Sequenz von AhbD zu finden sind, von denen allerdings nur zwei (C256 und C274) bei den anderen beiden Proteinen in einer Clusterbindung involviert sind. Auf Grund des ähnlichen Bindemotives von AhbD zu dem von anSMEcpe sind mit größter Wahrscheinlichkeit die Cysteine 312, 315, 321 und 342 des AhbD an einer Bindung eines zusätzlichen [4Fe-4S]-Cluster beteiligt und Cystein 324 wäre somit nicht involviert.

AhbD	241	EISVKT	HGYE	AMTKG	C	-LGGTGF	C	--FVSSVGKVFP	C	GYLPV	---	L	AGNIRE	Q	P	F	R	E	I	292																																
MoaA	245	EIGLIM	PYEK	DFC	A	T	C	-----	N	R	L	V	S	S	I	G	K	L	H	L	C	L	F	G	E	G	G	-----	V	N	L	R	D	L	286																	
anSMEcpe	244	LETILL	---	G	K	S	S	S	C	G	M	N	G	T	C	T	C	Q	F	V	V	E	S	D	G	S	V	Y	P	C	D	F	Y	V	L	D	k	w	R	L	G	N	I	Q	D	M	T	M	K	E	L	297
AhbD	293	WENAEVFRKL	R	D	P	E	E	L	K	G	K	C	G	I	C	E	Y	K	K	V	C	-A	G	C	R	A	R	A	Y	A	A	T	G	D	Y	L	E	E	E	P	Y	C	(7)	349								
MoaA	287	LEDDTQQQ	A	L	E	A	R	I	S	-----	-----	A	A	L	R	E	K	K	Q	T	H	F	L	H	Q	N	N	T	G	(10)	329																					
anSMEcpe	298	FETNKNHEF	I	K	L	S	F	K	V	H	E	E	C	K	K	C	K	W	F	R	L	C	k	G	G	C	R	R	C	R	D	S	K	E	D	S	A	L	E	L	N	Y	C	(22)	370							

Abbildung 3.15: Aminosäure-Sequenzalignment der C-terminalen Region der RS-Enzyme AhbD, MoaA und anSMEcpe. Dargestellt sind die AS-Sequenzen der RS-Enzyme AhbD aus *M. barkeri*, MoaA aus *E. coli* sowie anSME aus *C. perfringens* (anSMEcpe). Die C-terminalen Regionen mit ggf. potentiell involvierten Cysteinen zur Bindung eines zweiten zusätzlichen Clusters in AhbD sind hervorgehoben. (rot): Cysteine ohne genauere Charakterisierung auf [Fe-S]-Cluster-Bindung. (grün unterlegt): Cysteine, die ein zusätzliches [4Fe-4S]-Cluster binden; (hellblau unterlegt): Cysteine, die ein zweites zusätzliches [4Fe-4S]-Cluster binden; (blau und grau): andere AS.

3.3.3 *In-vitro*-Enzymaktivitätstest für natives AhbD

Um die Aktivität des gereinigten AhbD zu ermitteln sollte ein anaerober *in-vitro*-Enzymtest etabliert werden (2.4.18). Da AhbD zur RS-Familie gehört, wurde ein Testansatz verwendet, in dem SAM sowie ein Reduktionsmittel zur Initiierung der Reaktion eingesetzt wurden (1.4.2). Außerdem wurde der Enzymtest anaerob durchgeführt, da die in AhbD enthaltenen [Fe-S]-Cluster sehr Sauerstoff-labil sind (1.4.1). Für den Enzymtest wurden insgesamt 20 µM des Substrats Fe-Copro III, 500 µM Cosubstrat SAM, 1 mM des starken Reduktionsmittels Natriumdithionit (DT) sowie 5 µM des gereinigten AhbD in AhbCD-Puffer eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 0 h, 6 h sowie 15 h bei 17 °C wurden die Reaktionen wie zuvor beschrieben gestoppt, die Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Die Umsetzung von Fe-Copro III durch AhbD konnte durch eine Abnahme des Substrat-Peaks bei gleichzeitiger Zunahme des Häm-Peaks bei einer Retentionszeit von 37,5 min bestätigt werden (Abbildung 3.16, obere Chromatogramme). Nach 15 h war das gesamte Substrat zu Häm umgewandelt worden. Ein zusätzlicher Peak nach 6 h Inkubation war bei einer Retentionszeit von 30,1 min auszumachen, der nach 15 h wieder verschwand. Dies deutete auf die Bildung eines potentiellen Intermediates hin, bei dem zunächst nur eine Propionatgruppe des Fe-Copro III zu einer Vinylgruppe umgewandelt wurde.

In der Tat konnte für das AhbD aus *D. desulfuricans* und *D. vulgaris* dieses Monovinyl-Intermediat identifiziert werden, wobei allerdings unklar ist, ob das Intermediat an der Position C3 oder C8 decarboxyliert worden ist (Bali *et al.*, 2011; Lobo *et al.*, 2014). Durch das Auftreten eines distinkten Monovinyl-Intermediat-Peaks ist allerdings anzunehmen, dass die Reaktion zunächst an einer der beiden Positionen begünstigt wird und die Reaktion von Fe-Copro III zu Häm in zwei Schritten ablaufen könnte. Eine Negativ-Kontrolle ohne zugesetztes AhbD zeigte, dass das Fe-Copro III im Enzymansatz relativ stabil vorlag (Abbildung 3.16, unteres Chromatogramm). Für das resultierende Häm zeigte sich, dass es durch das Auftreten weiterer kleinerer Peaks zum Abbau neigte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das native, rekonstituierte AhbD, welches vermutlich zwei [4Fe-4S]-Cluster enthielt, in der Lage war Fe-Copro III zu Häm umzusetzen. Hiermit war der Nachweis erbracht, dass AhbD aus *M. barkeri* die Häm-Synthase des alternativen Häm-Biosynthesewegs in diesem Organismus darstellt.

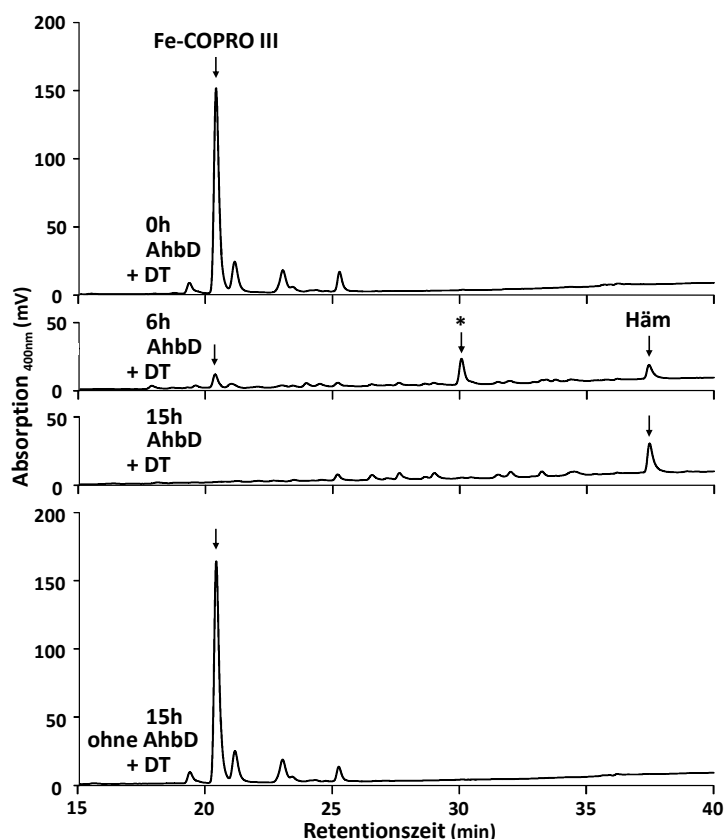


Abbildung 3.16: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von nativem AhbD. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M gereinigtem und rekonstituiertem nativem AhbD, 20 μ M Fe-Copro III, 500 μ M SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 0 h, 6 h sowie 15 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert (obere Chromatogramme). Als Kontrolle diente eine Probe nach 15 h Inkubation, der kein AhbD zugesetzt worden war (unteres Chromatogramm). (*): Monovinyl-Intermediat.

3.3.4 Aerobe Reinigung von AhbD mit N-terminalem His-Tag

Nachdem das native AhbD ohne einen fusionierten Tag erfolgreich produziert, gereinigt und die Mengen an enthaltenem Eisen und Schwefel bestimmt werden konnten sowie ein *in-vitro*-Enzymtest etabliert worden war, wurde AhbD aus *M. barkeri* zur vereinfachten Reinigung mit einem fusionierten N-terminalen His-Tag produziert. Information über eine potentielle störende Interaktion des His-Tags mit dem N-terminal lokalisierten [4Fe-4S]-Cluster sollte der Vergleich beider gereinigter Varianten des AhbD liefern.

Die rekombinante Produktion von AhbD aus *M. barkeri* mit N-terminalem His-Tag erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3) unter der Verwendung des Plasmids pETDuetahbD/HIS (2.4.12). Da im verwendeten Expressionsplasmid das Gen *ahbD* mit der entsprechenden codierenden Sequenz für den His-Tag fusioniert wurde, konnte der Zellextrakt auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen und das Protein durch Interaktion mit den Nickelionen gereinigt werden (2.4.2).

AhbD wurde mittels His-Tag erfolgreich gereinigt. Die Elutionsfraktionen E1-E8, welche die höchsten Konzentrationen an AhbD aufwiesen (Abbildung 3.17), wurden vereinigt und das enthaltene Imidazol durch einen Pufferwechsel entfernt (2.4.4).

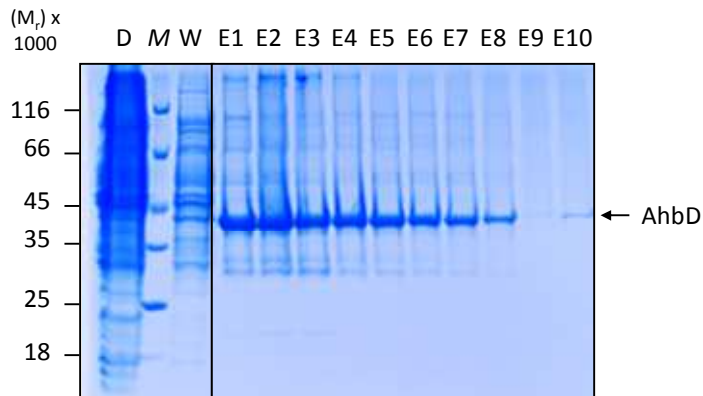


Abbildung 3.17: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Reinigung über IMAC (Ni-NTA-Agarose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen während der Reinigung zur Ermittlung des AhbD-Gehalts der Elutionsfraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (D): Proteine im Säulen-Durchlauf, (M): Unstained Protein MW Marker; (W): Proteine in der Wasch-Fraktion; (E1-E10): Proteine der Elutionsfraktionen 1-10 von je 2 mL.

Zur Optimierung der Proteinreinheit zur Durchführung erster Charakterisierungen des AhbD wurde dieses rekonstituiert um sicherzustellen, dass alle vorhandenen Cluster im Protein koordiniert wurden (2.4.16). Im Anschluss wurde das AhbD in einem zweiten Reinigungsschritt durch eine präparative GPC von höher- und niedermolekularen Proteinen getrennt (2.4.7). Die Proteinlösung wurde hierbei auf eine 120 mL HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200pg-Säule aufgetragen, sodass die einzelnen Proteine entsprechend ihrer Größe und Konformation voneinander separiert werden konnten.

Das resultierende Chromatogramm zeigte verschiedene Proteinpeaks, darunter der Protein-Peak mit der höchsten Absorption, welcher AhbD repräsentierte und in den Fraktionen 20-25 aufgefangen wurde (Abbildung 3.18). Die Peaks mit geringeren Retentionszeiten, resultierten aus höhermolekularen Proteinen, welche zuerst von der Säule eluiert wurden, da sie nicht mit den Poren der Matrix interagierten. Anhand einer SDS-PAGE-Analyse (2.4.3) konnte in nahezu allen Fraktionen AhbD ausgemacht werden, das im Unterschied zu dem in den Fraktionen 20-25 noch immer mit anderen Proteinen assoziiert zu sein schienen (Abbildung 3.19). Diese Verunreinigungen könnten z.B. Chaperone sein, welche an AhbD gebunden sind. Da die Banden der Verunreinigungen allerdings nicht sehr stark ausgeprägt sind, scheinen die einzelnen Peaks des Chromatogramms die verschiedenen Oligomerisierungszustände des AhbD zu repräsentieren, wobei der erste distinkte Peak einem Aggregat, der zweite einem Homodimer und der dritte einem AhbD-Monomer zugeordnet werden könnte.

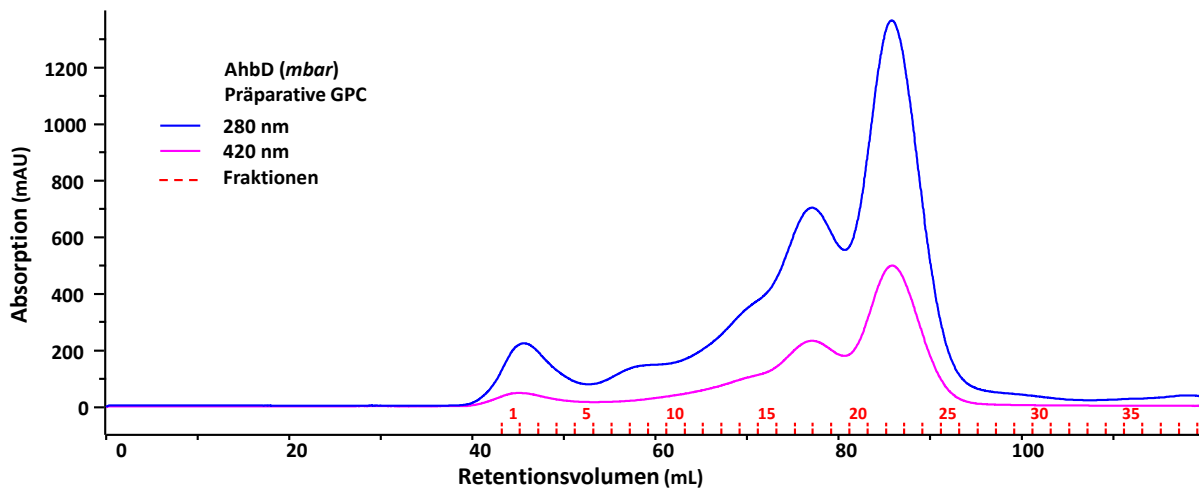


Abbildung 3.18: Chromatogramm der AhbD-Proteinreinigung über präparative GPC am Äkta™ Purifier. Es eluierten drei distinkte Protein-Peaks, welche sowohl bei 280 nm als auch bei 420 nm eine Absorption aufwiesen und vermutlich verschiedene Oligomerisierungszustände des AhbD repräsentierten.

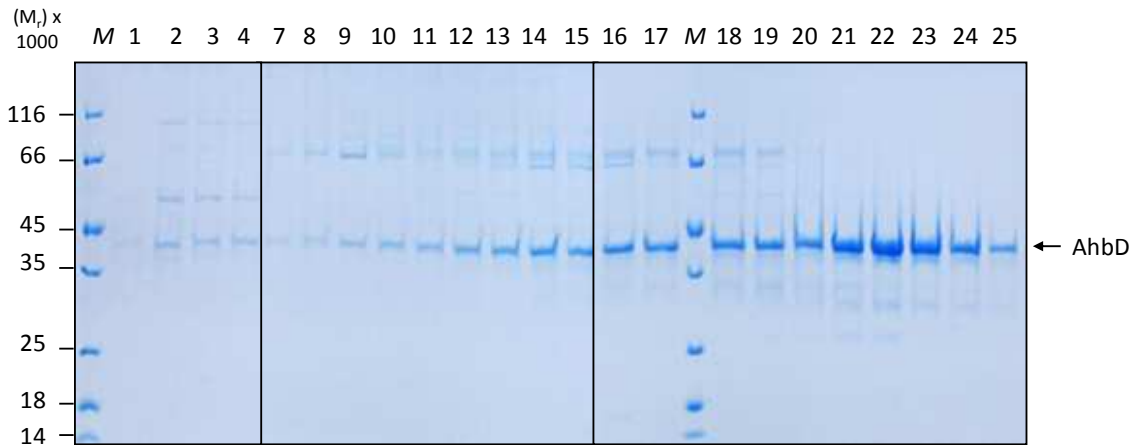


Abbildung 3.19: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Reinigung über präparative GPC, Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen während der Reinigung zur Ermittlung des AhbD-Gehalts der Elutionsfraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (M): Unstained Protein MW Marker; (1-25): Proteine der Fraktionen 1-25 von je 1 mL.

Das gereinigte AhbD mit N-terminalem His-Tag wurde bei 4 °C unter aeroben Bedingungen zwischengelagert bevor damit erste Charakterisierungen durchgeführt wurden.

3.3.5 *In-vitro*-Charakterisierung des AhbD mit His-Tag

Bestimmung des Fe- und S-Gehalts von AhbD

Zur Überprüfung der [4Fe-4S]-Cluster-Bindung von gereinigtem AhbD wurde ein UV/Vis-Spektrum des gereinigten Proteins nach der IMAC aufgenommen (2.4.13). Das UV/Vis-Spektrum des aerob gereinigten AhbD mit His-Tag wies vor der Rekonstitution nur eine durch die Aminosäuren des Proteins bedingte Absorption bei 280 nm auf (Abbildung 3.20 (a)). Eine typische Schulter bei 410 nm konnte erahnt werden, jedoch stand diese in keinem Verhältnis zur Proteinkonzentration. Die aerobe Reinigung des AhbD führte zu einer Sauerstoff-bedingten Degradation der gebundenen [4Fe-4S]-Cluster des Proteins. Nach der chemischen Rekonstitution des AhbD zeigte das UV/Vis-Spektrum eine Absorptionsschulter bei 410 nm, was eine deutliche Erhöhung des Clustereinbaus der beiden potentiellen [4Fe-4S]-Cluster implizierte (Abbildung 3.20 (b)). Im Vergleich zum rekonstituierten nativ gereinigten AhbD (3.3.2) war eine Absorption bei 318 nm deutlich zu erkennen, welche durch gebundene Eisenionen an das Protein auftritt (Grimm *et al.*, 2010). Diese Bindung kann auch in geringem Maße durch einen His-Tag hervorgerufen werden.

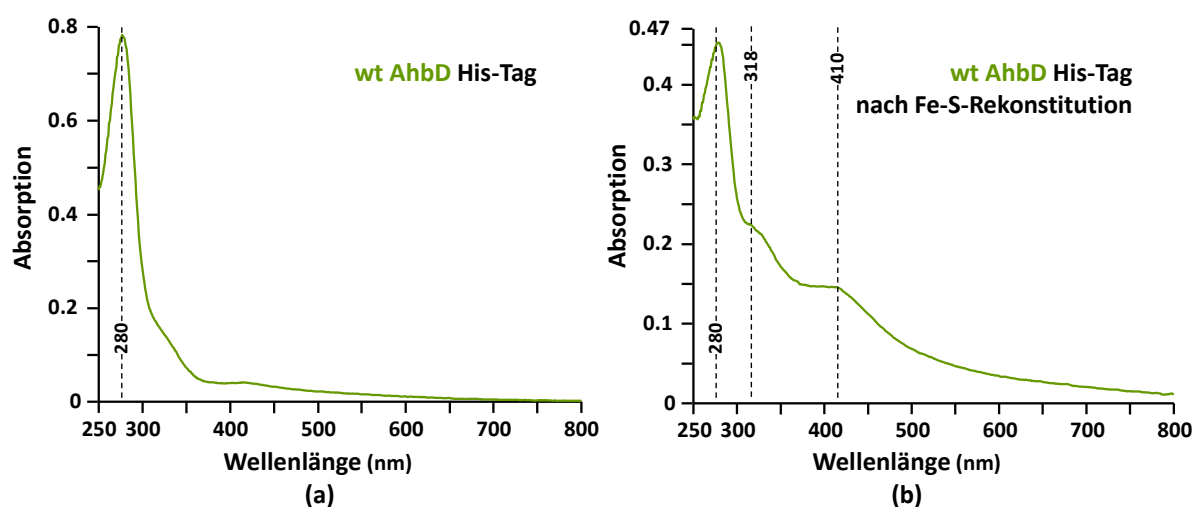


Abbildung 3.20: UV/Vis-Spektrum des AhbD mit His-Tag vor GPC. (a) Aerob gereinigtes AhbD weist nur ein deutliches Absorptionsmaximum bei 280 nm auf (AhbD: 5,1 mg/mL). (b) Nach chemischer Eisen-Schwefel-Rekonstitution des Proteins zeigt sich eine Schulter bei 318 nm sowie eine Absorptionsschulter bei 410 nm, welche charakteristisch für ein Protein mit enthaltenem [4Fe-4S]-Cluster ist (AhbD: 3,4 mg/mL). Küvettendicke: 1 mm, Blank: AhbD-Puffer.

Die colorimetrische Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts der Proteinlösung ergab für aerob gereinigtes AhbD mit N-terminalem His-Tag einen Wert von 1,69 mol Eisen und 1,94 mol Sulfid pro mol AhbD vor Rekonstitution. Nach der Rekonstitution wurden allerdings vergleichbare Werte zum nativen AhbD mit 7,6 mol Eisen und 7,5 mol Sulfid pro mol AhbD

ermittelt (3.3.2). Diese Messwerte bestätigten, dass die Reinigung von AhbD mit N-terminal fusioniertem His-Tag keine Auswirkung auf die Bindung der beiden [4Fe-4S]-Cluster besitzt.

Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von AhbD

Zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von AhbD wurde eine analytische GPC durchgeführt (2.4.7). Die gereinigte AhbD-Proteinprobe wurde hierbei nach der präparativen GPC (3.3.4) über eine 24 mL Superdex™ 200 10/300 GL-Säule nach der Rekonstitution analysiert. Durch eine vorherige analytische GPC von verschiedenen Protein-Eichlösungen bekannten molekularen Gewichts konnte eine Kalibrierungsgerade generiert werden. Mit dieser Geraden wurde das molekulare Gewicht von AhbD durch sein Retentionsvolumen bestimmt und somit auf seinen Oligomerisierungszustand geschlossen (Abbildung 3.21).

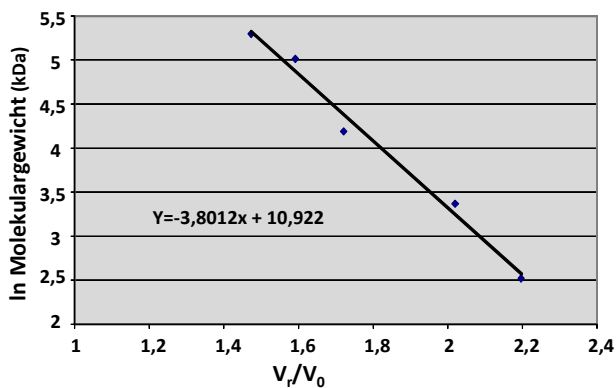


Abbildung 3.21: Kalibrierungsgerade zur Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von AhbD mit His-Tag. Verwendet wurde das Gel Filtration Marker Kit für ein molekulares Proteingewicht von 12.000-200.000 Da von Sigma-Aldrich. Die Ermittlung der Eichgerade wurde von Maria Höninger durchgeführt.

Das für AhbD resultierende Chromatogramm zeigte hauptsächlich die Elution von zwei distinkten Proteinpeaks (Abbildung 3.22 (a)). Die höchste Absorption wies ein Peak mit einem Retentionsvolumen von 16,2 mL auf, was nach Berechnung einem molekularen Gewicht von ca. 36,8 kDa entsprach (Abbildung 3.22 (b)). Der Proteinpeak mit geringerer Absorption und daher mit geringerem Proteingehalt wurde nach 14,7 mL von der Säule eluiert, was einem molekularen Gewicht von 71,2 kDa entsprach. Beide ermittelten Werte bestätigen das Auftreten von AhbD in monomerer (38,6 kDa) sowie dimerer Form (77,2 kDa), wobei unter den gegebenen Bedingungen AhbD hauptsächlich als Monomer vorlag.

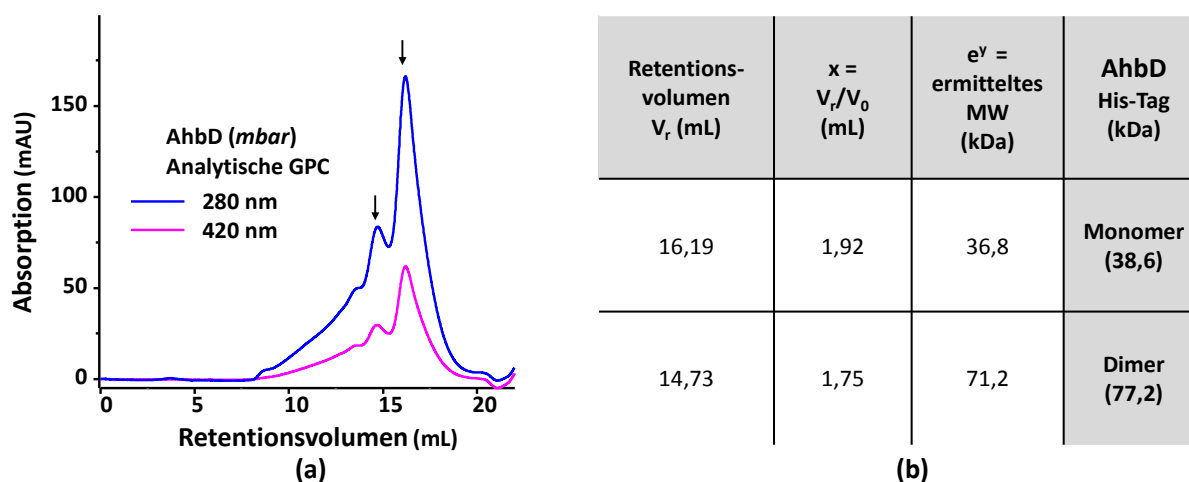


Abbildung 3.22: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von AhbD mit His-Tag. (a) Chromatogramm der analytischen GPC des gereinigten AhbD. Die Protein-elution erfolgte in zwei distinkten Peaks (Pfeile). (b) Die Berechnung des zugehörigen molekularen Gewichts ergab, dass AhbD neben einer dimeren Form vor allem als Monomer vorlag. Das Leervolumen V_0 betrug 8,412 mL, welches durch den Proteinstandard Blue Dextran ermittelt werden konnte.

Auch die CPO HemN aus *E. coli*, welche ebenfalls die Reaktion von zwei Propionatgruppen zu zwei Vinylgruppen an den gleichen Positionen in einem Porphyrinogen-Grundgerüst katalysiert, liegt als monomeres Enzym vor (Layer *et al.*, 2002). Dies ist jedoch nicht für jedes RS-Enzym gegeben, da z.B. die Biotin-Synthase BioB aus *E. coli* in seiner aktiven Form als Dimer vorliegt (Berkovitch *et al.*, 2004).

3.3.6 *In-vitro*-Enzymtest für AhbD mit His-Tag

Um die Aktivität des gereinigten AhbD mit fusioniertem His-Tag nachzuweisen wurde der mit nativem AhbD etablierte *in-vitro*-Enzymtest durchgeführt (3.3.3). Für den Enzymtest wurden ebenfalls 20 μ M des Substrats Fe-Copro III, 500 μ M Cosubstrat SAM, 1 mM DT sowie 5 μ M des gereinigten AhbD in AhbCD-Puffer eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 0 h, 3 h, 6 h und 23 h bei 17 °C wurden die Reaktionen gestoppt, die Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Anders als bei nativem AhbD konnte in den ersten *in-vitro*-Enzymtests eine Umsetzung von Fe-Copro III zu Häm erst nach 23 h nachgewiesen werden (Abbildung 3.23). Dies konnte sowohl durch einen entstandenen Häm-Peak als auch durch eine deutliche Abnahme des Substrat-Peaks sowie das Auftreten des Monovinyl-Intermediats ausgemacht werden. In späteren Tests lief die Umsetzung von Fe-Copro III allerdings auch für das AhbD mit His-Tag vergleichbar schnell wie mit nativem AhbD ab. Vermutlich enthielt die erste Präparation weniger aktives AhbD.

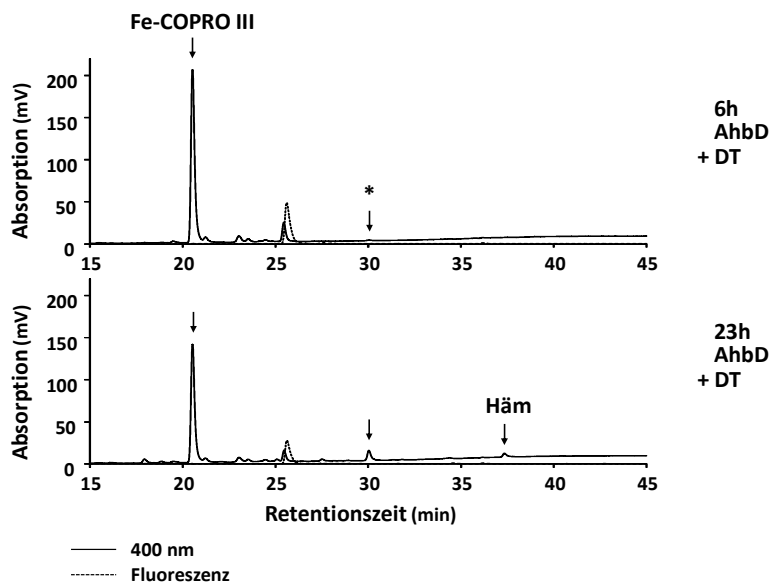


Abbildung 3.23: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbD mit His-Tag. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M gereinigtem und rekonstituiertem AhbD, 20 μ M Fe-Copro III, 500 μ M SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 6 h sowie 23 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Eine komplette Umsetzung des Fe-Copro III zu Häm oder Monovinyl-Intermediat konnte nach 23 h noch nicht nachgewiesen werden. (*): Monovinyl-Intermediat. Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte durch Mandy Messal und Lucile Wendt.

Um die Enzymaktivität zu optimieren, wurden mit der gleichen AhbD-Charge *in-vitro*-Enzymtests bei modifizierter Temperatur von 30 °C sowie 37 °C oder modifiziertem pH-Wert des CD-Puffers von pH 7,2 sowie pH 8,0 durchgeführt.

Der Enzymtest zeigte bei einer Inkubation bei 37 °C eine erhöhte Umsetzungsrate für Fe-Copro III im Vergleich zu einer Inkubations-Temperatur von 30 °C. Bereits nach 4,5 h wurde das Substrat des bei 37 °C inkubierten Reaktionsansatzes entweder zu Monovinyl-Intermediat oder zu Häm umgesetzt (Abbildung 3.24 (a)). Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C war selbst nach 6 h Inkubationszeit noch immer Fe-Copro III im Ansatz aufzufinden (Abbildung 3.24 (b)). Das Temperatur-Optimum von AhbD aus *M. barkeri* liegt demnach bei 37 °C, was nicht überraschend ist, da das Temperatur-Optimum von *M. barkeri*-Zellen ebenfalls 37 °C beträgt.

Eine Analyse beider Testansätze nach 22 h zeigte, dass bei beiden Temperaturen die Reaktion komplett abgelaufen war. Interessanter Weise wurde eine Abnahme des Häm-Peaks bei zeitgleichem Auftreten zweier deutlicher Peaks bei einer Retentionszeit von 25,3 min und 27,7 min beobachtet, welche vermutlich aus dem Abbau von Häm resultierten. AhbD ist an diesem Abbau nicht beteiligt, da sowohl eine Inkubation des Enzymansatzes mit Hemin an Stelle des Substrats in Anwesenheit oder Abwesenheit von AhbD zu einem Abbau des Häms

fürte (Daten nicht gezeigt). Da ein enzymatischer Abbau des Häms durch AhbD ausgeschlossen werden kann, ist vermutlich die Kombination aus Inkubationstemperatur und/oder DT eine mögliche Ursache für die Degradation des Häms. Da eine Umsetzung von Fe-Copro III zu Häm auch bei niedrigeren Temperaturen komplett ablaufen kann, wurden die folgenden Versuche bei 17 °C durchgeführt um Degradationsprodukte zu vermeiden.

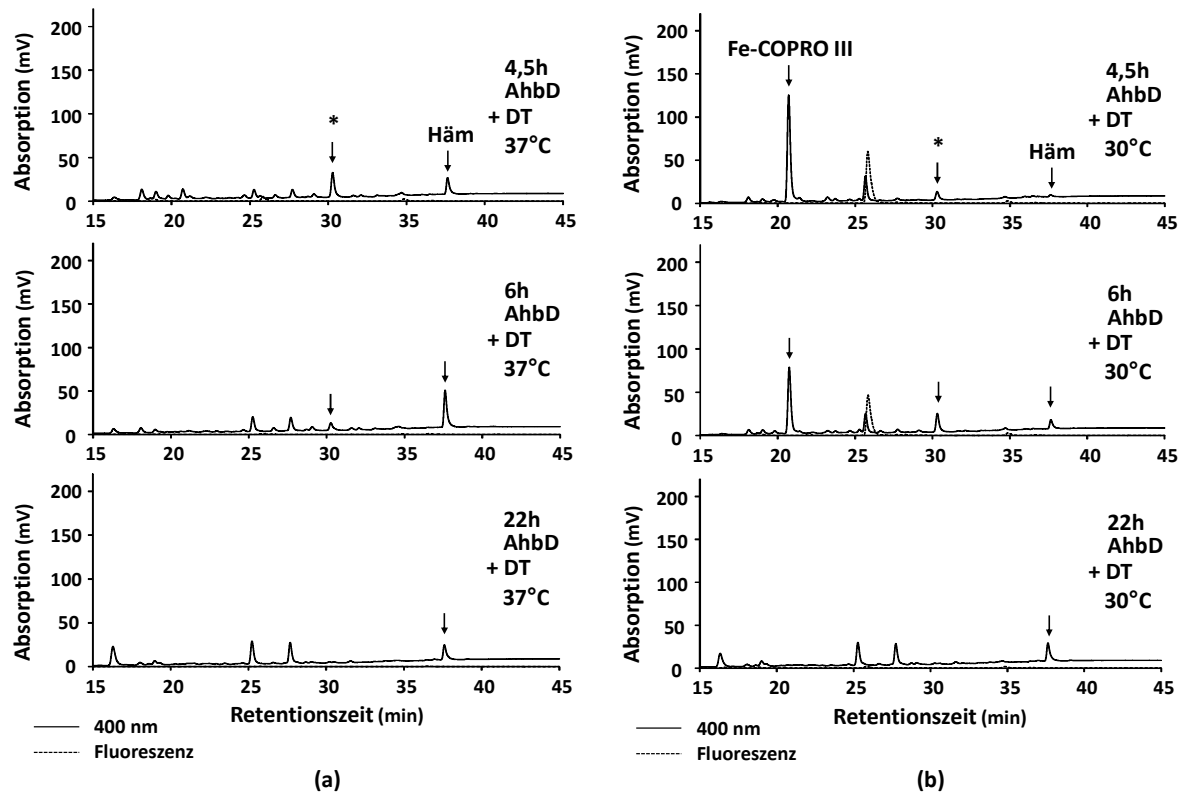


Abbildung 3.24: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbD mit His-Tag bei unterschiedlichen Temperaturen. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M gereinigtem und rekonstituiertem AhbD, 20 μ M Fe-Copro III, 500 μ M SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 4,5 h, 6 h sowie 22 h Inkubationszeit im CD-Puffer mit Standard-pH-Wert von 7,5 bei (a) 37 °C sowie (b) 30 °C analysiert. Eine Beschleunigte Reaktion ist bei höheren Temperaturen von 37 °C zu beobachten. (*): Monovinyl-Intermediat.

Zur Ermittlung, ob AhbD aus *M. barkeri* eine höhere Aktivität bei leicht niedrigeren pH-Werten oder leicht erhöhten pH-Werten aufweist, wurde der bisher verwendete CD-Puffer modifiziert, indem an Stelle von 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), Tris-HCl (pH 7,2) bzw. (pH 8,0) verwendet wurden.

Die Umsetzung von Fe-Copro III war in den Ansätzen mit pH 8,0 sowie pH 7,5 nahezu identisch (Daten nicht gezeigt). Bei einem pH-Wert von 7,2 wurde die Reaktion beschleunigt, da im Vergleich zu den anderen Ansätzen bereits nach 4,5 h das gesamte Substrat entweder zu Monovinyl-Intermediat oder zu Häm umgesetzt worden war (Abbildung 3.25 (a)). Bei pH 7,5 wurde eine Umsetzung von Fe-Copro III zu Häm erst nach 6 h deutlich (Abbildung 3.25 (b)). Das pH-Optimum von AhbD aus *M. barkeri* scheint demnach in einem niedrigeren pH-

Bereich als 7,5 zu liegen. Da allerdings die Degradation von Häm bei niedrigerem pH-Wert, wie auch schon vorher bei höheren Temperaturen beobachtet, begünstigt zu sein schien, wurde der AhbD-Aktivitätstest im Folgenden weiterhin bei pH 7,5 durchgeführt.

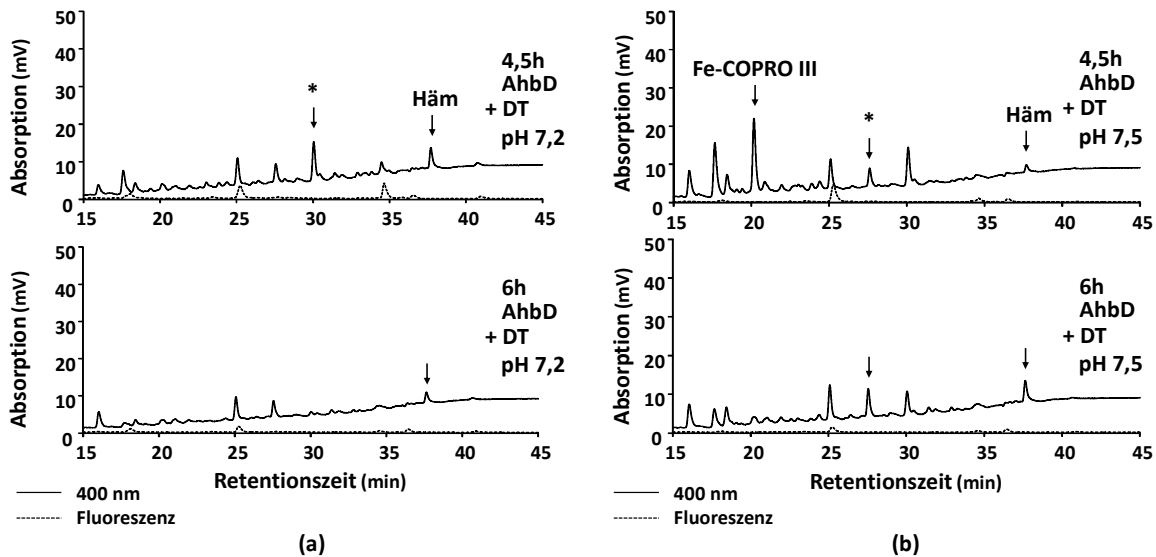


Abbildung 3.25: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbD mit His-Tag bei unterschiedlichen pH-Werten. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M gereinigtem und rekonstituiertem AhbD, 20 μ M Fe-Copro III, 500 μ M SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 4,5 h sowie 6 h Inkubationszeit bei 17 °C in modifiziertem CD-Puffer mit (a) pH-Wert von 7,2 sowie (b) pH 7,5 analysiert. Eine beschleunigte Reaktion ist bei niedrigerem pH-Wert von 7,2 zu beobachten. (*): Monovinyl-Intermediat.

3.4 Charakterisierung der [Fe-S]-Cluster von AhbD

3.4.1 Generierung von AhbD-Varianten mit nur je einem [Fe-S]-Cluster

Durch die Erzeugung von spezifischen AhbD-Cystein-Varianten, welche entweder das N- oder das C-terminale Cluster nicht mehr koordinierten, sollten beide [4Fe-4S]-Cluster im Protein näher charakterisiert werden. Hierzu wurde zunächst das Plasmid pETDuetahbD/HIS zur Produktion von AhbD mit N-terminalem His-Tag modifiziert. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese der Codon-Triplets TGT bzw. TGC zu dem Triplet GCT bzw. GCC wurden spezifische Cysteine der Aminosäuresequenz des AhbD durch Alanine ausgetauscht (2.3.1). Zur Generierung einer AhbD-Variante ohne N-terminales Cluster (AhbD C19A/C23A) wurden die Nukleotide 55 und 56 sowie 67 und 68 ausgetauscht um anstelle von Cystein 19 und 23 jeweils ein Alanin zu erhalten. Für eine AhbD-Variante ohne C-terminales Cluster (AhbD C321A/C324A) wurden die Cysteine 321 und 324 durch Mutagenese der Nukleotide 961 und 962 sowie 970 und 971 ausgetauscht (für eine Übersicht der Sequenzen, siehe Anhang). Die Struktur des anSMecpe (3.3.2) war zum Zeitpunkt der Generierung beider Varianten noch nicht aufgeklärt. Daher wurde angenommen, dass das Cystein 324 an einer Ligation des C-terminalen [4Fe-4S]-Clusters des AhbD beteiligt ist.

3.4.2 Aerobe Reinigung der AhbD-[Fe-S]-Varianten mit N-terminalem His-Tag

Die rekombinante Produktion der AhbD-Protein-Varianten aus *M. barkeri* mit N-terminalem His-Tag erfolgte aerob in *E. coli* BL21(DE3) unter der Verwendung der resultierenden Plasmide pETDuetahbDp.C19,23A/HIS oder pETDuetahbDp.C321,324A/HIS (2.4.12). Die AhbD-Varianten AhbD C19A/C23A sowie AhbD C321A/C324A wurden analog zum Wildtyp-Protein durch den fusionierten His-Tag über IMAC gereinigt (2.4.2).

Für beide AhbD-Varianten wiesen hierbei die Elutionsfraktionen E1-E5 die höchsten Konzentrationen des entsprechenden Proteins auf (Abbildung 3.26 (a,b)). Es konnten im Verhältnis zur eluierten Menge der AhbD-Varianten nur geringe Mengen an Verunreinigungen durch andere Proteine ausgemacht werden, welche in AhbD C321A/C324A etwas höher konzentriert vorlagen als in AhbD C19A/C23A. Eine analoge Reinigung des wt AhbD zeigte, dass auch hier in geringem Maße unerwünschte nieder- oder höhermolekulare Proteine aufzufinden waren (Abbildung 3.26 (c)). Für alle drei

Reinigungen erfolgte während des Waschschriffs mit 20 mM Imidazol eine geringfügige frühe Elution des jeweiligen AhbD-Proteins, was durch eine verminderte Imidazolkonzentration im Wasch-Puffer reduziert werden könnte. Insgesamt wurden jedoch aus 2 L Zellkultur 45 mg AhbD C19A/C23A bzw. entsprechend 48 mg AhbD C321A/C324A erhalten. Als Vergleich hierzu wurden aus 1,5 L Zellkultur 37,2 mg des wt AhbD gewonnen. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Varianten ebenso wie der wt erfolgreich überproduziert wurden ohne dass eine vermeintliche Fehlfaltung beider Proteine zu deren Anreicherung in *inclusion bodies* führte oder sie mit Chaperonen assoziiert vorlagen.

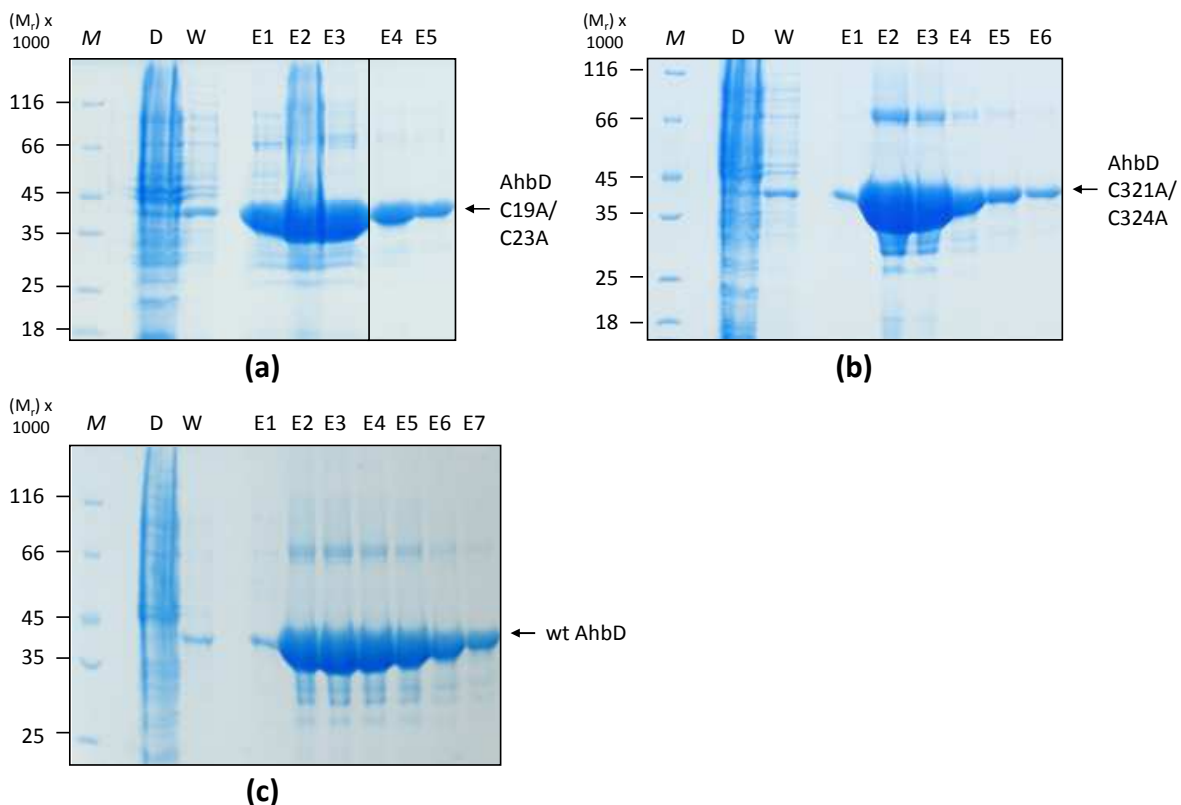


Abbildung 3.26: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Varianten-Reinigung im Vergleich zum wt AhbD über IMAC (Ni-NTA-Agarose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen während der Reinigung zur Ermittlung (a, b) der jeweiligen AhbD-Varianten bzw. (c) der wt AhbD beinhaltenden Elutionsfraktionen und deren Reinheit. Wt AhbD sowie dessen Varianten mit einer relativen molekularen Masse von jeweils 38.600 sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Alle drei separaten Reinigungen wurden analog durchgeführt, um einen Vergleich zu ermöglichen. (M): Unstained Protein MW Marker; (D): Proteine im Säulen-Durchlauf, (W): Proteine in der Wasch-Fraktion; (E1-E7): Proteine der Elutionsfraktionen 1-7, (a) 1-2 je 1,5 mL und 3-5 je 750 µL, (b) 2-3 je 1,5 mL und 1, 4-6 je 750 µL, (c) 2-3 je 1,5 mL und 1, 4-7 je 750 µL.

Die gereinigten AhbD-Varianten AhbD C19A/C23A und AhbD C321A/C324A sowie das wt Protein wurden bei 4 °C unter aeroben Bedingungen gelagert bevor die chemische Rekonstitution der [Fe-S]-Cluster erfolgte (2.4.16).

3.4.3 Bestimmung des Fe- und S-Gehalts der AhbD-Varianten nach Rekonstitution

Nach der chemischen Rekonstitution der [4Fe-4S]-Cluster wurde zunächst ein UV/Vis-Spektrum der AhbD-Varianten aufgenommen (2.4.13). Wie im Falle des gereinigten wt AhbD (3.3.5) wiesen beide AhbD-Varianten einen Protein-Absorptionspeak bei 280 nm, eine schwache Schulter bei 318 nm sowie eine breite Schulter bei 410 nm auf (Abbildung 3.27). Dies impliziert eine erfolgreiche Rekonstitution der [4Fe-4S]-Cluster.

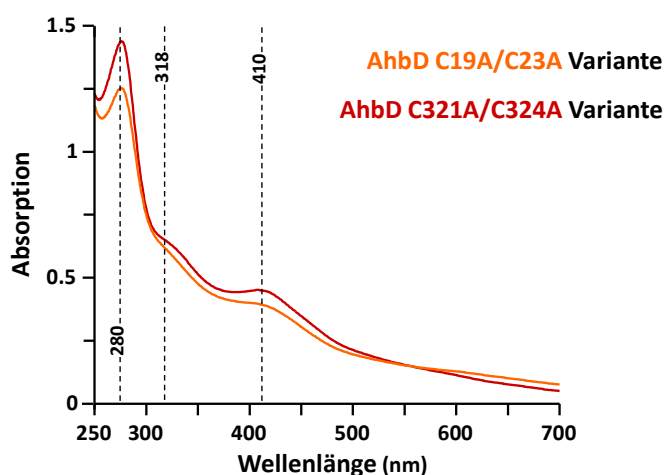


Abbildung 3.27: UV/Vis-Spektren der AhbD-Varianten mit His-Tag. Nach chemischer Eisen-Schwefel-Rekonstitution der Proteine zeigte sich bei beiden Varianten ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, eine schwache Schulter bei 318 nm sowie eine Absorptionsschulter bei 410 nm, welche charakteristisch für Proteine mit [4Fe-4S]-Cluster ist (AhbD C321A/C324A und AhbD C19A/C23A: 1,5 mg/mL). Küvettendicke: 10 mm, Blank: AhbD-Puffer.

Da das wt AhbD im Gegensatz zu den beiden AhbD-Varianten zwei [4Fe-4S]-Cluster koordinieren sollte, wurde zur Ermittlung der Anzahl gebundener Cluster für alle drei Proteinlösungen der Gehalt an Eisen und Schwefel colorimetrisch bestimmt (2.4.15).

Für die rekonstituierten AhbD-Varianten ergaben sich Werte von 2,9 mol Eisen und 2,5 mol Sulfid pro mol AhbD C321A/C324A sowie 3,6 mol Eisen und 2,7 mol Sulfid pro mol AhbD C19A/C23A (Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Im Vergleich zu den Werten des analog analysierten wt AhbD wurden in beiden AhbD-Varianten nur 43,3 % bzw. 53,7 % Eisen und 51,0 % bzw. 55,1 % Sulfid pro Protein ermittelt.

Diese Werte in Kombination mit den UV/Vis-Spektren lassen auf die Koordinierung von nur jeweils einem [4Fe-4S]-Cluster in beiden AhbD-Varianten schließen.

Tabelle 3.1: Eisen-Bestimmung von AhbD und AhbD-Varianten. Anhand einer Geraden mit der Gleichung $y = 0,072 x$ konnte eine Fe-Konzentration von 6,7 nmol pro nmol wt AhbD ermittelt werden (AhbD: 4,2 mg/mL). Für AhbD C321A/C324A konnten 2,9 nmol Fe sowie für AhbD C19A/C23A 3,6 Fe pro nmol Protein ermittelt werden (AhbD C321A/C324A: 4,8 mg/mL; AhbD C19A/C23A: 4,0 mg/mL).

wt AhbD	AhbD (nmol)	Differenz 435nm- 580nm	Fe (nmol)	AhbD C321A/ C324A	AhbD- Var. (nmol)	Differenz 435nm- 580nm	Fe (nmol)	AhbD C19A/ C23A	AhbD- Var. (nmol)	Differenz 435nm- 580nm	Fe (nmol)
10 μ L	1,087	0,515	7,152	10 μ L	1,243	0,263	3,646	10 μ L	1,035	0,266	3,692
20 μ L	2,174	1,080	15,01	20 μ L	2,485	0,524	7,283	20 μ L	2,070	0,548	7,617
\emptyset 6,7 Fe/AhbD (\pm 100%)				\emptyset 2,9 Fe/AhbD-Variante (\pm 43,3%)				\emptyset 3,6 Fe/AhbD-Variante (\pm 53,7%)			

Tabelle 3.2: Schwefel-Bestimmung von AhbD und AhbD-Varianten. Anhand einer Geraden mit der Gleichung $y = 0,0542 x$ konnte eine S^{2-} -Konzentration von 4,9 nmol pro nmol wt AhbD ermittelt werden (AhbD: 4,1 mg/mL). Für AhbD C321A/C324A konnten 2,5 nmol S^{2-} sowie für AhbD C19A/C23A 2,7 nmol S^{2-} pro nmol Protein ermittelt werden (AhbD C321A/C324A: 4,5 mg/mL; AhbD C19A/C23A: 3,9 mg/mL).

wt AhbD	AhbD (nmol)	670nm	S^{2-} (nmol)	AhbD C321A/ C324A	AhbD- Var. (nmol)	670nm	S^{2-} (nmol)	AhbD C19A/ C23A	AhbD- Var. (nmol)	670nm	S^{2-} (nmol)
50 μ L	5,305	1,432	26,42	50 μ L	5,823	0,715	13,19	50 μ L	5,047	0,736	13,58
75 μ L	7,971	2,049	37,80	75 μ L	8,747	1,100	20,29	75 μ L	7,583	1,117	20,60
\emptyset 4,9 S^{2-} /AhbD (\pm 100%)				\emptyset 2,5 S^{2-} /AhbD-Variante (\pm 51,0%)				\emptyset 2,7 S^{2-} /AhbD-Variante (\pm 55,1%)			

3.4.4 ESR-Spektroskopie von AhbD und AhbD-Varianten

Um den vollständigen Einbau der [4Fe-4S]-Cluster in wt AhbD als auch in beide AhbD-Varianten zu bestätigen wurde eine externe Elektronenspinresonanz-Spektroskopie am Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion in Mülheim an der Ruhr von Dr. Edward J. Reijerse durchgeführt (2.5.3). Hierzu wurden zunächst die entsprechenden Proteinlösungen konzentriert und mit dem Reduktionsmittel Natriumdithionit (DT) versetzt, bevor sie in flüssigem Stickstoff bis zur Vermessung zwischengelagert wurden. Durch das Hinzufügen von DT zur Proteinlösung wurden die $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster zu $[4Fe-4S]^{1+}$ -Cluster reduziert. Diese konnten im Anschluss mittels ESR-Spektroskopie in einem magnetischen Feld analysiert werden, da mit dieser Methode nur ungepaarte Elektronen in ein Spektrum resultieren.

Die Messungen von AhbD C321A/C324A und AhbD C19A/C23A wiesen jeweils typische Signale für ein $[4Fe-4S]^{1+}$ -Cluster auf, wie es auch in anderen RS-Enzymen auftritt (Duin *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2007). Die jeweiligen ESR-Signale der beiden AhbD-Varianten wiesen jedoch deutliche Unterschiede auf (Abbildung 3.28 (c,d)), was dafür spricht, dass jeweils verschiedene Cluster vorlagen. Eine Addition der Spektren der beiden AhbD-

Varianten resultierte in einem Spektrum, welches dem des wt AhbD entsprach (Abbildung 3.28 (a,b)).

Diese Ergebnisse bestätigten die Anwesenheit von zwei unterschiedlichen $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Clustern am N-terminalen und am C-terminalen Ende des AhbD aus *M. barkeri*, die beide durch DT reduziert werden konnten.

In den generierten AhbD-Varianten AhbD C321A/C324A und AhbD C19A/C23A konnte also jeweils eines der beiden $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster erfolgreich entfernt werden ohne den Einbau des zweiten Clusters zu beeinträchtigen. Die Variante AhbD C321A/C324A war demnach nur noch in der Lage das N-terminale $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster zu koordinieren und die Variante AhbD C19A/C23A nur noch das C-terminale $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster, wodurch eine individuelle Charakterisierung der Cluster in den beiden Varianten in folgenden Experimenten durchgeführt werden konnte.

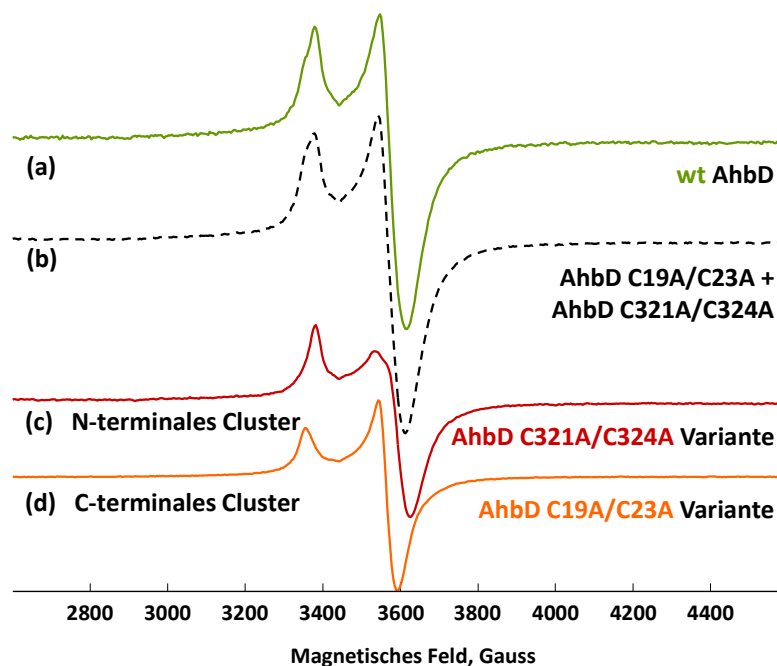


Abbildung 3.28: ESR-Spektren von wt AhbD und AhbD-Varianten. (a) ESR-Spektrum von wt AhbD mit typischen Signalen für $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster. Die ESR-Spektren von (c) AhbD C321A/C324A mit N-terminalem Cluster ($g = 1,036 / 1,927 / 1,894$) und (d) AhbD C19A/C23A mit C-terminalem Cluster ($g = 2,053 / 1,921 / 1,925$) zeigen unterschiedliche Signale für jeweils ein gebundenes $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster. (b) Die Summe der beiden Spektren der AhbD-Varianten führt zur Generierung eines ESR-Spektrums, dass dem des wt AhbD entspricht. Alle Spektren wurden nach der Reduktion der Proteidlösungen mit 10 mM DT bei 10 K aufgenommen (wt AhbD: 435 μM , AhbD C321A/C324A: 383 μM , AhbD C19A/C23A: 419 μM).

3.4.5 *In-vitro*-Enzymtest von AhbD und AhbD-Varianten

Um die Funktion der beiden $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster näher zu charakterisieren wurden die beiden AhbD-Varianten, welche wie oben beschrieben nur noch das N-terminale oder das C-terminale Cluster enthielten, auf ihre Enzymaktivität *in vitro* getestet (2.4.18). Für

den Enzymtest wurden 20 μM des Substrats Fe-Copro III, 500 μM Cosubstrat SAM, 1 mM DT sowie 5 μM des entsprechenden Proteins in AhbD-Puffer eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 17 °C wurden die Reaktionen gestoppt, die Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Sowohl im Ansatz mit AhbD C19A/C23A als auch mit AhbD C321A/C324A konnte im Vergleich zum wt AhbD, bei dem nach 24 h das gesamte Fe-Copro III zu Monovinyl-Intermediat oder Häm umgesetzt wurde, keine Enzymaktivität beobachtet werden (Abbildung 3.29). Beide [4Fe-4S]-Cluster des AhbD scheinen demnach für die Enzymaktivität des AhbD essentiell zu sein.

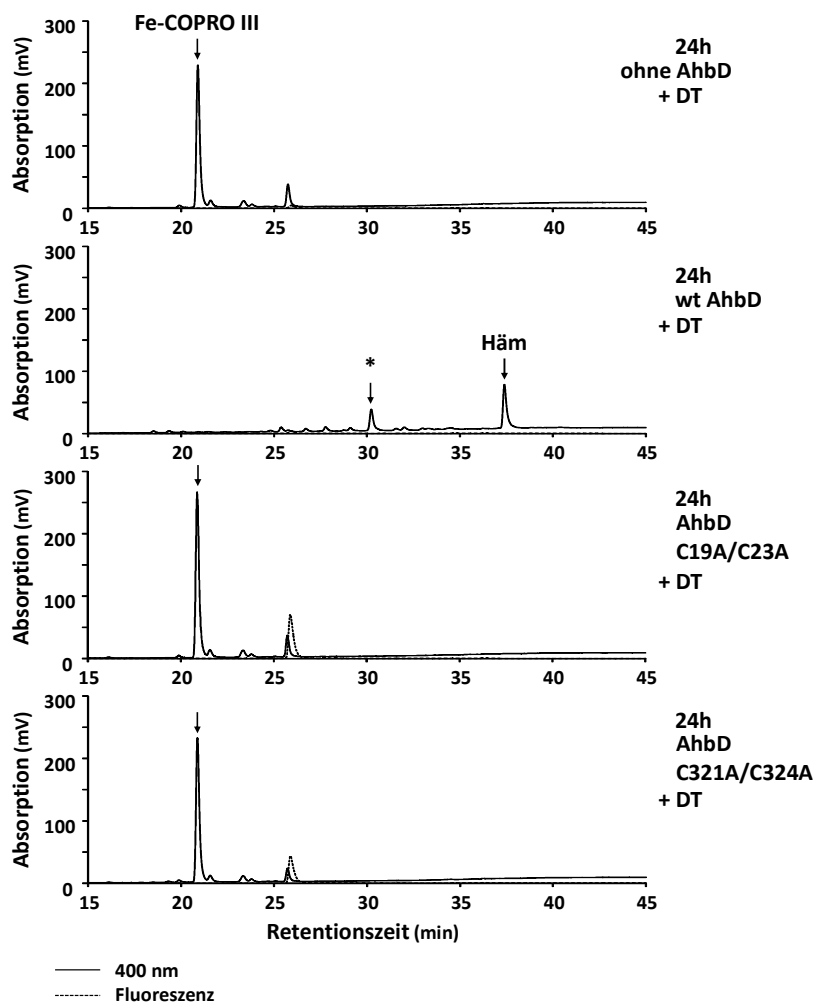


Abbildung 3.29: Chromatogramme der HPLC-Analyse der *in-vitro*-Enzymtests von wt AhbD und AhbD-Varianten. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μM wt AhbD, AhbD C321A/C324A oder AhbD C19A/C23A, 20 μM Fe-Copro III, 500 μM SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Eine komplette Umsetzung des Fe-Copro III zu Monovinyl-Intermediat oder zu Häm konnte nach 24 h nur für wt AhbD ermittelt werden. Beide Varianten zeigen wie die Negativ-Kontrolle ohne Protein weder eine Abnahme des Substratpeaks noch eine Generierung von Monovinyl-Intermediat oder Häm. (*): Monovinyl-Intermediat.

Die Notwendigkeit von beiden Clustern ist nicht überraschend, denn andere RS-Enzyme mit zusätzlichem [Fe-S]-Cluster, bei denen spezifische Cysteine des C-Terminus durch Alanine

ersetzt wurden, waren ebenfalls nicht mehr in der Lage ihre Reaktion zu katalysieren, darunter MiaB aus *E. coli*, welches an der Modifizierung von tRNA beteiligt ist (Pierrel *et al.*, 2002), die bereits erwähnte Biotin-Synthase BioB aus *E. coli* (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2002) sowie die Subtilosin A-Maturase AlbA aus *Bacillus subtilis* (Flühe *et al.*, 2013). Für die meisten RS-Enzyme mit zusätzlichen [Fe-S]-Clustern ist die Funktion der Cluster allerdings noch unklar (Lanz & Booker, 2012).

3.4.6 SAM-Spaltungstest von wt AhbD und AhbD-Varianten

Die von AhbD katalysierte Gesamtreaktion beinhaltet die schrittweise Umsetzung von zwei Propionatgruppen zu zwei Vinylgruppen. Hierzu ist die homolytische Spaltung von SAM unter Bildung von Methionin sowie des reaktiven Deoxyadenosyl-Radikals essentiell, welches dann durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms der entsprechenden Propionatgruppe zu 5'-Deoxyadenosin (DOA) abreagiert. Durch das Auftreten eines zweiten [4Fe-4S]-Clusters in AhbD wäre die Vorstellung, dass jedes der einzelnen Cluster jeweils ein DOA-Radikal für die beiden Teilreaktionen liefern könnte durchaus vorstellbar. Um die SAM-Spaltung durch das N-terminale [4Fe-4S]-Cluster von AhbD zu bestätigen sowie das zusätzliche [4Fe-4S]-Cluster auf eine potentielle Spaltung von SAM zu untersuchen, wurde ein SAM-Spaltungstest mit wt AhbD sowie beiden AhbD-Varianten durchgeführt (2.4.19). Hierbei erfolgte der Nachweis der SAM-Spaltung im *in-vitro*-Enzymtest durch den Nachweis des gebildeten DOA.

Für den SAM-Spaltungstest wurden 1 mM Cosubstrat SAM, 1 mM DT sowie 5 μ M des entsprechenden Proteins in AhbCD-Puffer eingesetzt. Der Test wurde entweder ohne die Zugabe des Substrats Fe-Copro III sowie zum Vergleich mit 20 μ M Fe-Copro III durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 17 °C wurden die Reaktionen gestoppt, das DOA extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Die HPLC-Chromatogramme der Proben, die bei einer Wellenlänge von 254 nm aufgezeichnet wurden, zeigten im Fall der Ansätze ohne Fe-Copro III kein Auftreten von DOA (Abbildung 3.30, oberes Chromatogramm). Nur in Anwesenheit des Substrats Fe-Copro III konnte für das wt AhbD eine erfolgreiche Spaltung des SAM nachgewiesen werden, was in einer Anhäufung von DOA in der Probe resultierte (Abbildung 3.30, zweites Chromatogramm). Für AhbD C321A/C324A, welches nur noch in der Lage war das N-terminale Cluster zu koordinieren, konnte ebenfalls die Bildung von DOA nachgewiesen werden, wodurch die postulierte Funktion des N-terminal lokalisierten [4Fe-4S]-Clusters von AhbD aus *M. barkeri* als RS-Cluster bestätigt werden konnte (Abbildung 3.30, vorletztes

Chromatogramm). Im Gegensatz dazu konnte AhbD C19A/C23A, welches nur das C-terminale, zusätzliche [4Fe-4S]-Cluster koordinierte, das Cosubstrat SAM nicht spalten, wodurch eine Beteiligung des zusätzlichen Clusters an einer weiteren SAM-Spaltung ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 3.30, mittleres Chromatogramm).

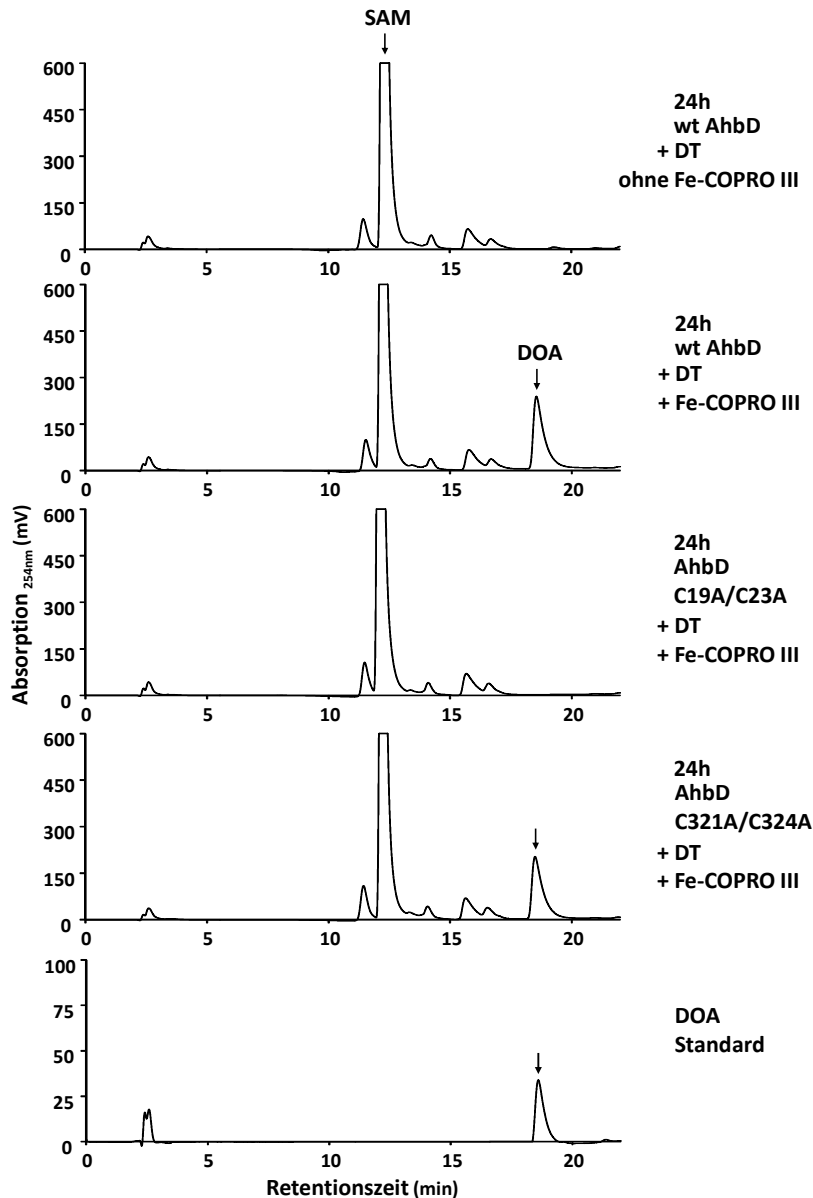


Abbildung 3.30: Chromatogramme der HPLC-Analyse der SAM-Spaltungstests von wt AhbD und AhbD-Varianten. Die DOA-Bildung der Spaltungstest-Ansätze mit 5 μ M wt AhbD, AhbD C321A/C324A oder AhbD C19A/C23A, 0 μ M oder 20 μ M Fe-Copro III, 1 mM SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Ohne Fe-Copro III konnte keine DOA-Bildung ermittelt werden (oberes Chromatogramm). Bei Anwesenheit von Fe-Copro III zeigten die Ansätze mit wt AhbD oder AhbD C321A/C324A das Auftreten eines DOA-Peaks. AhbD C19A/C23A wies keine Anhäufung von DOA in einer identisch behandelten Probe auf (mittleres Chromatogramm).

Interessanter Weise ist nicht bei allen RS-Enzymen die Anwesenheit des entsprechenden Substrats für die Spaltung des SAM während eines *in-vitro*-Enzymtests notwendig. Wie bei

den Enzymen HydE und HydG jedoch wird im Allgemeinen die Spaltungsrate bei dessen Anwesenheit deutlich erhöht (Broderick *et al.*, 2014).

AhbD benötigt, wie hier gezeigt, für eine detektierbare SAM-Spaltung *in vitro* sein Substrat Fe-Copro III. Auch andere RS-Enzyme wie die CPO HemN und RlmN benötigen ihr jeweiliges Substrat Copro'gen bzw. 23S rRNA für eine nachweisbare Spaltung von SAM. Für die weitere Reaktion des DOA-Radikals kann in diesen Fällen vermutlich nur ein Wasserstoffatom des Substrats abstrahiert werden wohingegen bei anderen Enzymen auch ein Wasserstoffatom aus dem Lösemittel oder dem Enzym selbst verwendet werden könnte. Nicht auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass die Bindung des Substrats eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum zur Folge hat, wodurch das SAM-Molekül erst in der Lage ist richtig an das [4Fe-4S]-Cluster zu binden (siehe folgende Kapitel).

3.4.7 Elektrochemische Untersuchungen von wt AhbD und AhbD-Varianten

Sowohl AhbD C321A/C324A als auch AhbD C19A/C23A konnten durch die Zugabe von Dithionit reduziert und damit beide $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster im ESR sichtbar gemacht werden. Demnach waren beide Cluster redoxaktiv (3.4.4). Um die Redoxprozesse der Cluster genauer zu untersuchen, wurden die Redox-Potentiale des jeweiligen $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Clusters durch zyklische Voltammetrie des wt AhbD als auch beider AhbD-Varianten extern von Peter Schweyen am Institut für Anorganische und Analytische Chemie der TU Braunschweig ermittelt (2.5.4). Hierbei wurden den entsprechenden Proteinlösungen mit ggf. zuvor zugefügten Additiven in einer anaeroben 3-Elektroden-Messzelle eine lineare Spannung angelegt und die Reduktions- bzw. Oxidationsströme in einem Voltammogramm aufgezeichnet. Als Elektroden dienten eine Silber/Silberchlorid-Referenzelektrode, eine Glaskohlenstoff-Elektrode als Arbeits-Elektrode sowie ein Platindraht als Gegen-Elektrode. Für das wt AhbD konnte trotz zweier redoxaktiver $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster nur ein Reduktions- und ein Oxidationsstrom innerhalb eines Spannungszyklus von -1,2 bis +0,1 V beobachtet werden (Anhang, Abbildung I). Das Auftreten beider Ströme stellt einen quasi-reversiblen Reduktionsprozess dar (Raman *et al.*, 2003). Für jede zykovoltammetrische Untersuchung wurden 20 Zyklen aufgezeichnet, wobei das Potential der Reduktion bzw. Oxidation innerhalb der ersten 10 Zyklen leicht driftete und für die folgenden 10 Zyklen konstant blieb. In dieser Arbeit werden nur diese konstanten Potentiale diskutiert. Das ermittelte Halbstufenpotential gegen NHE betrug -371 mV für das wt AhbD aus *M. barkeri*

(Tabelle 3.3). Dies ist konform zu den Redox-Potentialen für ähnliche Proteine mit zwei [4Fe-4S]-Clustern sowie dem homologen AhbD aus *D. vulgaris* mit -390 ± 10 mV, welches durch eine ESR-spektroskopisch beobachtete Redox-Titration erst kürzlich ermittelt wurde (Lobo *et al.*, 2014).

Die beiden Varianten AhbD C321A/C324A und AhbD C19A/C23A wiesen analoge Voltammogramme zum wt AhbD auf (Anhang, Abbildung I) und besaßen ein gemessenes Halbstufenpotential ihrer jeweiligen $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster von -344 mV bzw. -359 mV (Tabelle 3.3). Die beiden Potentiale der individuellen $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster liegen sehr dicht beieinander, sodass sie im wt AhbD nicht getrennt voneinander durch zwei charakteristische Redox-Prozesse auszumachen waren (Busch *et al.*, 1997). Diese nahe beieinander liegenden Redox-Potentiale, welche sich nicht signifikant voneinander unterscheiden, lassen darauf schließen, dass keine elektronische Interaktion zwischen beiden Clustern besteht, was auch der Beschreibung für andere Proteine mit zwei kubischen [4Fe-4S]-Clustern entspricht (Armstrong *et al.*, 1988).

Für das RS-Enzym Lysin-2,3-Aminomutase (LAM) wurde eine Erhöhung des Redox-Potentials des $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Clusters nach der Zugabe von SAM von -480 mV auf -430 mV beobachtet, wodurch biologische Reduktionssysteme in der Lage wären das RS-Cluster leichter zu reduzieren (S. C. Wang & Frey, 2007). Für den weiteren Elektronentransfer wurde postuliert, dass das Potential von freiem SAM durch die Bindung an das Cluster von -1.800 mV auf -990 mV erhöht wird sowie eine Bindung des Substrats Lysin in das aktive Zentrum der LAM zu einer drastischen Erniedrigung des bereits reduzierten Cluster-Potentials auf -600 mV führt. Dies würde die energetische Barriere des Elektronenflusses vom $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Cluster auf SAM verringern und somit erst ermöglichen. Die Halbstufenpotentiale beider $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster in AhbD wiesen allerdings keine signifikante Veränderung nach der Zugabe von SAM auf (Tabelle 3.3). Ebenso hatte die Zugabe von Fe-Copro III keinen Einfluss auf die Redox-Potentiale der beiden Cluster. Bei allen Messungen wurde für das zusätzliche, C-terminale Cluster von AhbD ein geringfügig negativeres Redox-Potential gemessen, was einen direkten Elektronenfluss vom N-terminalen auf das C-terminale Cluster unwahrscheinlich macht. Der potentielle Transfer eines Elektrons vom Fe^{2+} des radikalisierten Fe-Copro III auf das C-terminale Cluster wäre jedoch denkbar, da für freies Fe-Copro III ein Redox-Potential von ca. -655 mV für das $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Paar bestimmt wurde. In jedem Fall muss zur Reduktion des RS-Clusters ein Reduktionssystem mit niedrigerem Potential als -343 mV bis -396 mV dienen.

Tabelle 3.3: Halbstufenpotentiale von wt AhbD und AhbD-Varianten. Anhand der gemessenen Daten aus der durchgeführten zyklischen Voltammetrie konnten die jeweiligen Halbstufenpotentiale der [4Fe-4S]-Cluster durch die Messung der einzelnen Proteinlösungen mit oder ohne SAM bestimmt werden. Für wt AhbD ergab sich nur ein Wert, da die Potentiale beider Cluster zu dicht beieinander lagen. Die Halbstufenpotentiale sind gegen eine Normal-Wasserstoffelektrode (+210 mV) angegeben. Elektroden: Ag/AgCl (3 mol/L KCl), Pt- und Kohlenstoff.

	ΔE (V)		Halbstufenpotential $E_{1/2}$ (mV) gegen NHE	
	nativ	+ SAM	nativ	+ SAM
wt AhbD	-0.161	-0.186	-371	-396
AhbD C321A/C324A	-0.134	-0.133	-344	-343
AhbD C19A/C23A	-0.149	-0.156	-359	-366

Da unter der Zugabe von Fe-Copro III keine signifikante Veränderung des Redox-Potentials des RS-Clusters ermittelt werden konnte, muss ein anderer Mechanismus zum Schutz gegen unkontrollierte Generierung von DOA-Radikalen erfolgen, welche bei Abwesenheit des Substrats das Enzym schädigen könnten. Wie bereits zuvor erwähnt wäre es denkbar, dass erst die Bindung von Fe-Copro III die Bindung des Cosubstrates SAM an das RS-Cluster ermöglicht, was durch eine strukturelle Veränderung des Proteins bei Substratbindung hervorgerufen werden könnte. Im Fall der Biotinsynthase BioB konnte dessen Bindungsrate und Affinität zu SAM bei Substratbindung erhöht werden (Ugulava *et al.*, 2003). Eine Konformationsänderung des AhbD durch Substrat würde die nur bei Anwesenheit des Fe-Copro III detektierte SAM-Spaltung erklären (3.4.6).

3.4.8 *In-vitro*-Enzymtest von wt AhbD und AhbD-Varianten mit Ferredoxin

Dithionit wird in nahezu allen etablierten *in-vitro*-Enzymtests für RS-Enzyme eingesetzt (Broderick *et al.*, 2014). Nichtsdestotrotz ist es als sehr starkes Reduktionsmittel eigentlich nicht zur Untersuchung von physiologischen Prozessen geeignet, da es nicht nur RS-Cluster reduzieren kann sondern auch zu einer unspezifischen Reduktion aller im Enzymtest enthaltenen Substanzen führt. Daher wäre es sinnvoller, einen physiologischen Elektronen-Donor für *in-vitro*-Enzymtests zu verwenden. Allerdings ist in *M. barkeri* der physiologische Elektronen-Donor zur Reduktion des RS-Clusters sowie der potentiell benötigte Elektronen-Akzeptor bisher unbekannt. In den Genomen von *Methanosarcina*-Spezies konnten Gene

codierend für die Elektronen-Carrier-Proteine Ferredoxin, Flavodoxin, Rubredoxin, Eisen-Schwefel-Flavoprotein und Flavodoxin annotiert werden (Suharti *et al.*, 2008). Flavodoxin dient *in vivo* für einige RS-Enzyme als Elektronen-Donor und konnte auch erfolgreich in *in-vitro*-Enzymtests eingesetzt werden (Bianchi *et al.*, 1993; Ollagnier *et al.*, 1997; Wan & Jarrett, 2002). Das hierbei verwendete Flavodoxin-Reduktionssystem aus *E. coli* besteht aus dem bereits erwähnten Flavodoxin, einer Flavodoxin-NADP⁺-Reduktase sowie NADPH (Mulliez *et al.*, 2001) und ähnelt dem des Ferredoxin-Reduktionssystems, welches aus Ferredoxin (Fd), einer Ferredoxin-NAD(P)⁺-Reduktase (FNR) und NAD(P)H besteht. Ferredoxine sind in verschiedenen biologischen Prozessen involviert und besitzen im allgemeinen ein oder zwei [Fe-S]-Cluster (Aliverti *et al.*, 1995).

Im Folgenden wurde AhbD auf seine Reduktion und seine dadurch entstehende Aktivität durch ein physiologisches Ferredoxin-Reduktionssystem getestet. Hierzu wurde im *in-vitro*-Enzymtest an Stelle von Dithionit das Fd-Reduktionssystem aus *Spinacia oleracea* verwendet (2.4.18). Nach einer Inkubationszeit von 2 h bzw. 6 h bei 17 °C der Enzymtestproben mit 5 mU FNR, 9 µM Fd, 0,6 mM NADPH, 20 µM des Substrats Fe Copro III, 1 mM Cosubstrat SAM sowie 5 µM AhbD wurden die Reaktionen gestoppt, die Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Das wt AhbD hatte bereits nach 6 h nahezu alles Substrat zu Häm umgesetzt, d.h. die Katalyse wurde durch den Einsatz des Fd-Systems beschleunigt (Abbildung 3.31, oberes Chromatogramm). Da das Fd-System jedoch nur als Elektronen-Donor diente, wurde zur Optimierung des physiologischen *in-vitro*-Enzymtests versucht, die Umsetzung des Fe-Copro III zu Häm durch die Zugabe der künstlichen Elektronen-Akzeptoren Phenanzinmethosulfat (PMS) oder Tetramethylphenylendiamin (TMPD) zusätzlich zu beschleunigen. Ein Vergleich der Reaktionsansätze nach 2 h Inkubationszeit zeigte, dass eine Beschleunigung der Reaktion weder durch Zugabe von PMS noch TMPD im Vergleich zu einer Probe ohne Akzeptor erzielt werden konnte (Abbildung 3.31, untere Chromatogramme), was bedeutet, dass ein anderer noch unbekannter Elektronen-Akzeptor für die physiologische Reaktion benötigt wird.

Für beide AhbD-Varianten ergaben sich in allen analog durchgeführten physiologischen *in-vitro*-Enzymtests keinerlei Umsetzungsrate (Daten nicht gezeigt).

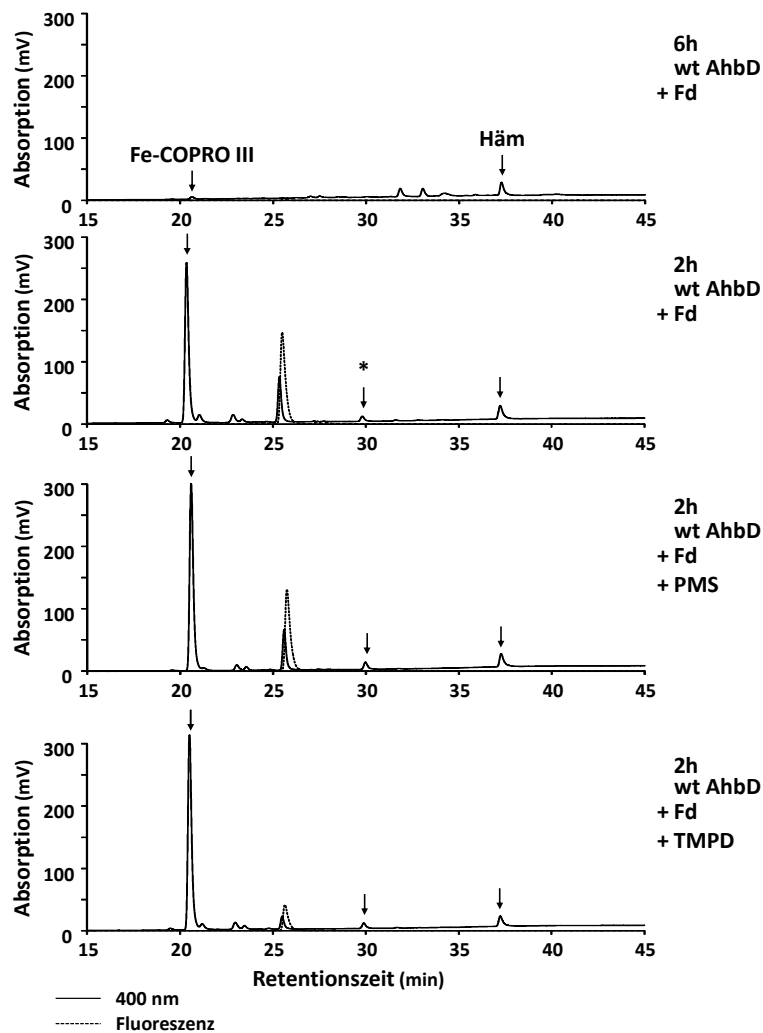


Abbildung 3.31: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbD mit Ferredoxin.

Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μM gereinigtem und rekonstituiertem AhbD, 20 μM Fe-Copro III, 1 mM SAM sowie 5 mU FNR, 9 μM Fd und 0,6 mM NADPH als Reduktionssystem wurden nach 6 h bzw. 2 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Eine fast komplette Umsetzung des Fe-Copro III zu Häm konnte bereits nach 6 h nachgewiesen werden (oberes Chromatogramm). Die Zugabe von 40 μM an künstlichen Elektronen-Akzeptoren wie PMS und TMPD zeigte keine Beschleunigung der Reaktion (untere Chromatogramme). (*): Monovinyl-Intermediat.

3.4.9 SAM-Spaltungstest von AhbD und AhbD-Varianten mit Ferredoxin

Um die Auswirkungen des physiologischen Ferredoxin-Reduktionssystems auf die SAM-Spaltung zu testen, wurde auch hier im *in-vitro*-Enzymtest Dithionit durch Ferredoxin ersetzt (3.4.8). Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 17 °C wurde das DOA nach dem Stoppen der Reaktion extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Für das wt AhbD, dessen Aktivität sich bereits zuvor im *in-vitro*-Enzymtest mit Ferredoxin erfolgreich bestätigen ließ (3.4.8 und Tabelle 3.4), konnte dementsprechend auch eine SAM-Spaltung durch die Detektion eines DOA-Peaks beobachtet werden (Abbildung 3.32, oberes Chromatogramm). AhbD C19A/C23A, welches keine Aktivität zeigte, war wie erwartet durch sein fehlendes RS-Cluster auch bei Einsatz des physiologischen Systems nicht in der Lage SAM zu spalten (Abbildung 3.32, mittleres Chromatogramm). Interessanter Weise konnte für AhbD C321A/C324A im Vergleich zu seiner SAM-Spaltungsfähigkeit mit DT (3.4.6 und Tabelle 3.4) unter Einsatz von Ferredoxin keine SAM-Spaltung mehr detektiert werden (Abbildung 3.32, unteres Chromatogramm).

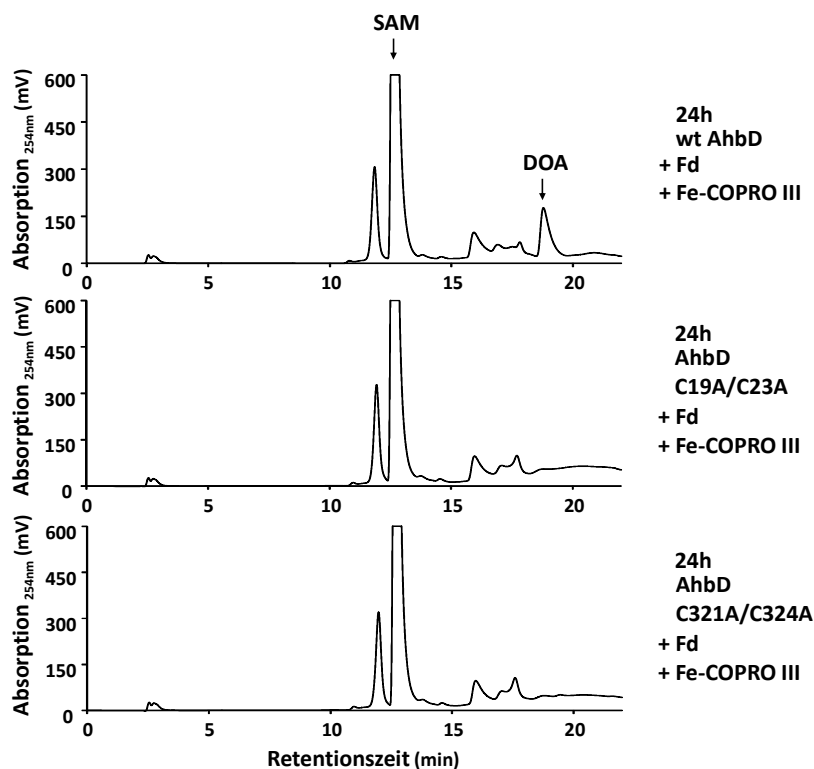


Abbildung 3.32: Chromatogramme der HPLC-Analyse der SAM-Spaltungstests von wt AhbD und AhbD-Varianten mit Ferredoxin. Der Gehalt an DOA der Spaltungstest-Ansätze mit 5 μ M wt AhbD, AhbD C321A/C324A oder AhbD C19A/C23A, 20 μ M Fe-Copro III, 1 mM SAM sowie 5 mU FNR, 9 μ M Fd und 0,6 mM NADPH als Reduktionssystem wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Der Ansatz mit wt AhbD zeigte auch unter physiologischen Bedingungen die Spaltung von SAM (oberes Chromatogramm) wohingegen AhbD C19A/C23A als auch AhbD C321A/C324A keine Spaltung von SAM aufwiesen (untere Chromatogramme).

Tabelle 3.4: Übersicht der Enzymaktivitäten und der SAM-Spaltungsergebnisse von wt AhbD und AhbD-Varianten. Nur wt AhbD ist enzymatisch aktiv. Eine SAM-Spaltung erfolgte durch DT im wt AhbD sowie für AhbD C321A/C324A nur in Anwesenheit von Fe-Copro III. Unter physiologischen Bedingungen (Fd) ist nur das wt AhbD in der Lage SAM zu spalten. AhbD C19A/C23A ist weder aktiv noch zeigte es eine SAM Spaltung. Ohne: ohne Substrat; (+): positiv; (-): negativ.

	Enzymaktivität		SAM-Spaltung			
			+ DT		+ Fd	
	+ DT	+ Fd	ohne	Fe-COPRO III	ohne	Fe-COPRO III
wt AhbD	+	+	-	+	-	+
AhbD C321A/C324A	-	-	-	+	-	-
AhbD C19A/C23A	-	-	-	-	-	-

3.4.10 Bindungsstudien mit dem Substrat Fe-Copro III

Um zu bestimmen ob das N- und das C-terminale [4Fe-4S]-Cluster an der Bindung des Substrats Fe-Copro III beteiligt sind, wurden spektroskopische Bindungsstudien durchgeführt (2.4.21).

Hierzu wurde zu einer verdünnten Substratlösung eine Proteinlösung von wt AhbD, AhbD C321A/C324A oder AhbD C19A/C23A hinzugefügt und sofort (0-100 s), nach 270 s (270-370 s) und nach 24 h ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen. In den Proben befand sich jeweils eine Endkonzentration von 5 μ M Fe-Copro III und 10 μ M Protein. Als Negativkontrollen dienten zusätzlich 5 μ M Fe-Copro III plus zugefügter Puffer oder eine zugefügte Lösung mit Alkohol-Dehydrogenase (ADH).

Fe-Copro III in Puffer wies eine Soret-Bande bei 382 nm sowie einen weiteren Peak bei ca. 350 nm auf (Abbildung 3.33 (a), blaues Spektrum). Das Auftreten des zweiten Peaks bei 350 nm deutete auf das Vorhandensein von dimerem Fe-Copro III hin, wohingegen der Peak bei 382 nm charakteristisch für monomeres Fe-Copro III ist (Tipping *et al.*, 1978). Bei Zugabe von Puffer alleine veränderte sich sowohl bei den sofortigen Messungen als auch nach 24 h das Absorptionsspektrum des Fe-Copro III nicht (Abbildung 3.33 (b,c), blaue Spektren). Auch das Hinzufügen von ADH zur Substratlösung führte zu keinerlei Veränderung (Abbildung 3.33, graues Spektrum). Durch die Zugabe von wt AhbD wurde die Soret-Bande des Fe-Copro III von 382 nm auf 390 nm verschoben, was auf eine Bindung des Enzyms an das Substrat schließen lässt (Abbildung 3.33 (a), grünes Spektrum). Nach einer Inkubation von 270 s verschob sich die Soret-Bande weiter zu 392 nm, bevor sie nach 24 h Inkubationszeit ihr Maximum von 396 nm erreichte (Abbildung 3.33 (b,c), grüne Spektren).

Sowohl die Zugabe von AhbD C321A/C324A als auch AhbD C19A/C23A resultierte in einer ähnlichen Verschiebung nach sofortiger Messung, wobei nur nicht signifikante Unterschiede in den Verschiebungen der anfänglichen Wellenlängen auftraten (Abbildung 3.33 (a), rotes und oranges Spektrum). Nach 24 h Inkubationszeit erreichte die Soret-Bande des gebundenen Substrats für beide AhbD-Varianten vergleichbare Wellenlängen zum wt AhbD (Abbildung 3.33 (b,c), rote und orangene Spektren). Dies zeigt eindeutig, dass beide AhbD-Varianten noch in der Lage waren wie das wt AhbD spezifisch Fe-Copro III zu binden und dass diese Bindung nicht durch eines der beiden Cluster vermittelt wird. Das zusätzliche C-terminale Cluster in AhbD ist demnach nicht essentiell an der Substratbindung beteiligt, worauf auch die vorherigen SAM-Spaltungstest hinwiesen, bei denen nur in Anwesenheit von Fe-Copro III eine SAM-Spaltung durch AhbD C321A/C324A möglich war (3.4.6).

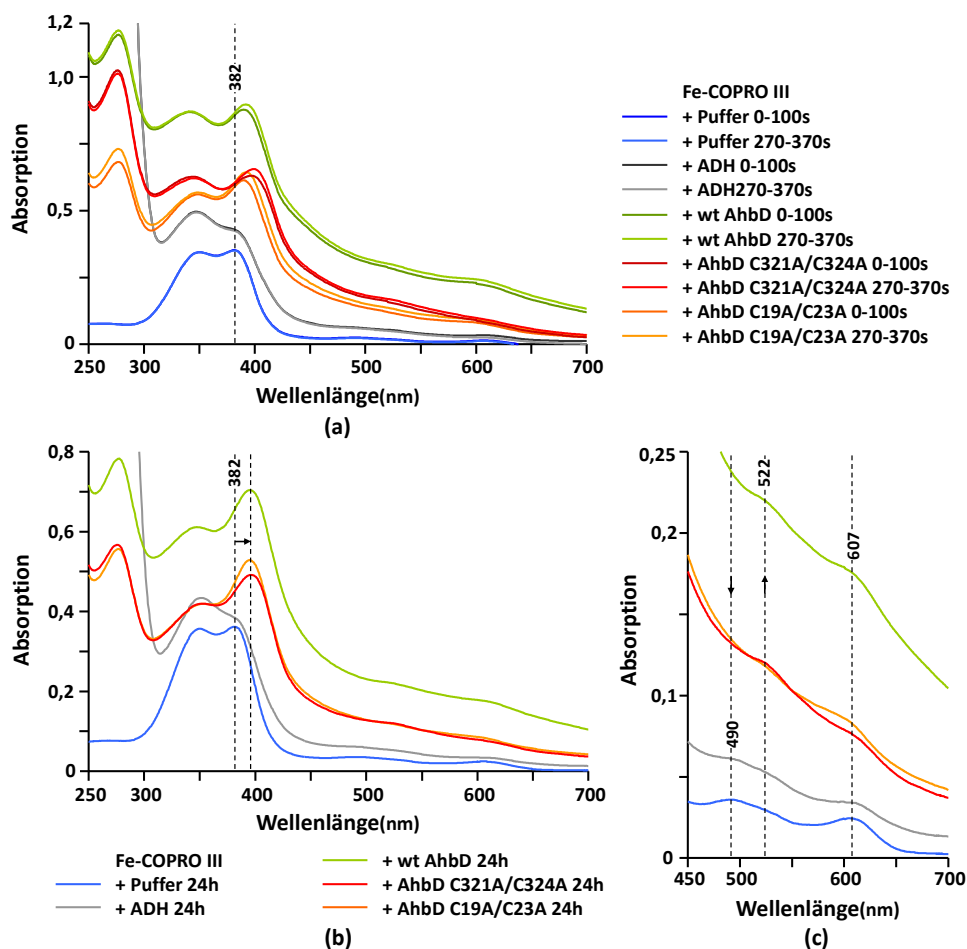


Abbildung 3.33: UV/Vis-Spektren der Fe-Copro III-Bindungsstudie mit wt AhbD und AhbD-Varianten. (a) UV/Vis-Spektren von Fe-Copro III nach Zugabe von wt AhbD, AhbD C321A/C324A oder AhbD C19A/C23A nach 0-100 s, 270-370 s und (b, c) 24 h Inkubationszeit. Bei Zugabe von wt AhbD oder den AhbD-Varianten verschiebt sich die Soret-Bande von Fe-Copro III in einen höheren Wellenlängenbereich unter zeitgleicher Erhöhung der Absorption. Der 490 nm-Peak des Fe-Copro III verschwindet bei Proteinbindung, während die Absorption bei 522 nm deutlicher wird. Alkohol-Dehydrogenase (ADH) und Fe-Copro III in AhbD-Puffer wurden als Negativ-Kontrolle vermessen.

In der Biotin-Synthase BioB ist das zusätzliche [2Fe-2S]-Cluster an der Bindung des Substrats Dethiobiotin beteiligt, was erst unter Zugabe von SAM ermöglicht wird (Ugulava *et al.*, 2003). AhbD zeigte in Anwesenheit von SAM keine Veränderung während der Fe-Copro III-Bindungsstudie (Daten nicht gezeigt).

Da das zusätzliche Cluster in AhbD weder für die Substratbindung noch für die SAM-Spaltung benötigt wird, wurde die Vermutung, dass das Cluster an den letzten Schritten der katalytischen Umsetzung von Fe-Copro III zu Häm beteiligt sein könnte, verstärkt. Da auf Grund der Daten der zyklischen Voltammetrie (3.4.7) eine Beteiligung des Substrats Fe-Copro III an einem Elektronentransfer über das C-terminale Cluster nicht auszuschließen war, wurde durch den Einsatz von Substratanaloga die Rolle des im Substrat chelatierten Eisens analysiert.

3.5 Interaktionen von AhbD mit Substratanaloga

3.5.1 Bindungsstudien mit Copro III, Cu-Copro III und Zn-Copro III

Um die Spezifität der Substratbindung von AhbD zu analysieren, wurde die Bindung des Fe-Copro III (3.4.10) mit der Bindung der Substratanaloga Coproporphyrin III (Copro III), Cu-Coproporphyrin III sowie Zn-Coproporphyrin III verglichen (2.4.21). In den vermessenen Proben befanden sich Endkonzentrationen von 5 μM des entsprechenden Substrats bzw. Substratanalogons sowie 10 μM bzw. 20 μM Protein. Als negative Kontrolle diente zusätzlich zugefügter Puffer zu der Porphyrin-Lösung.

Das UV/Vis-Spektrum des Fe-Copro III in Puffer zeigte sich während der Inkubationszeiten mit einer Soret-Bande des Monomers bei 382 nm und des Dimers bei 350 nm unverändert (Abbildung 3.34 (a)). Durch die Zugabe von 10 μM wt AhbD wurde die Soret-Bande des Fe-Copro III von 382 nm über 387 nm (1-100 s) auf 390 nm (270-370 s) verschoben, sowie bei 20 μM Protein auf 396 nm. Die Verschiebung hin zu höheren Wellenlängen deutet auf eine Bindung des Enzyms an das Substrat, welche spätestens nach 24 h ihr Maximum erreicht hatte (Abbildung 3.35 (a) und 3.4.10). Das Spektrum des Substratanalogons Copro III, welches kein chelatiertes Metallion in seinem Porphyringerüst besitzt, zeigte vier distinkte Q-Banden und eine Soret-Bande von 397 nm, deren Verschiebung unter Zugabe von wt AhbD ebenfalls zu höheren Wellenlängen beobachtet werden konnte (Abbildung 3.34 (b)). Bei Zugabe von 10 μM wt AhbD wurde insgesamt eine maximale Verschiebung bis auf 399 nm sowie für 20 μM auf 406 nm nach einer Inkubationszeit von 24 h ermittelt (Abbildung 3.35 (b)).

Die Metalloporphyrine Cu-Copro III und Zn-Copro III wiesen in AhbD-Puffer jeweils eine distinkte Soret-Bande auf, was darauf deutet, dass sie in einer homogenen, monomeren Porphyrin-Lösung vorlagen. Im Vergleich zu Zn-Copro III besitzt Cu-Copro III statt drei Q-Banden nur zwei, deren Veränderungen durch Bindung an wt AhbD kaum auszumachen war (Abbildung 3.35 (c, d)). Die geringere Anzahl an Q-Banden in Metalloporphyrinen ist im Vergleich zum nicht metallierten Porphyringerüst typisch (W. Zheng *et al.*, 2008b). Unter Zugabe von wt AhbD zeigte sich allerdings bei Cu-Copro III eine sehr deutliche Verschiebung der Soret-Bande von ursprünglich 379 nm auf 397 nm (10 μM wt AhbD) bzw. 398 nm (20 μM wt AhbD) bereits nach 270-370 s Inkubation (Abbildung 3.34 (c)). Im Fall von 10 μM wt AhbD war deutlich der Übergang von freiem zu gebundenem Cu-Copro III im UV/Vis-Spektrum zu erkennen, da sowohl noch ein Peak bei 379 nm als auch bereits ein neuer Peak bei 396 nm auszumachen war. Bei Zn-Copro III konnte dieser Übergang nicht

beobachtet werden, jedoch auch eine deutliche Verschiebung der Soret-Bande von 403 nm auf 408 nm ($10\ \mu\text{M}$ wt AhbD) bzw. 410 nm ($20\ \mu\text{M}$ wt AhbD) bereits nach 270-370 s Inkubationszeit (Abbildung 3.34 (d)).

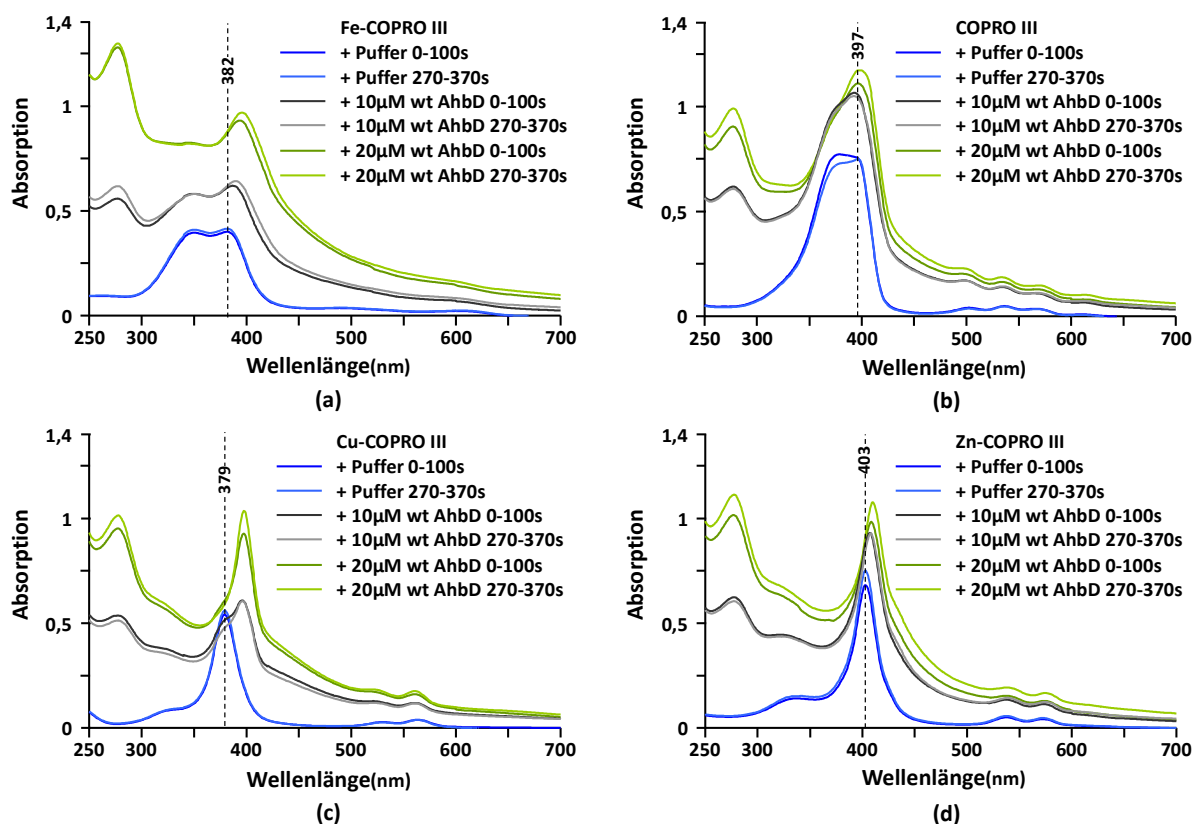


Abbildung 3.34: UV/Vis-Spektren der Substrat (-Analog)-Bindungsstudie mit wt AhbD. Dargestellt sind die UV/Vis-Spektren von (a) Fe-Copro III, (b) Copro III, (c) Cu-Copro III sowie (d) Zn-Copro III nach Zugabe von wt AhbD nach 0-100 s und 270-370 s Inkubationszeit. Das Substrat bzw. die Substratanaloga wurden jeweils als Negativ-Kontrolle in AhbD-Puffer vermessen. (a) Die Soret-Bande des Fe-Copro III verschiebt sich von 382 nm in einen höheren Wellenlängenbereich. (b) Die Soret-Bande des Copro III verschiebt sich von 397 nm in einen höheren Wellenlängenbereich. (c) Die distinkte Soret-Bande des Cu-Copro III verschiebt sich von 379 nm in einen höheren Wellenlängenbereich. (d) Die distinkte Soret-Bande des Zn-Copro III verschiebt sich von 403 nm in einen höheren Wellenlängenbereich. Alle Soret-Banden zeigten neben einer Verschiebung eine zeitgleiche Erhöhung der Absorption.

Die Verschiebung der Soret-Banden aller getesteten Substratanaloga zeigte, dass nicht nur Fe-Copro III durch das wt AhbD gebunden werden kann sondern auch Copro III, Cu-Copro III und Zn-Copro III. Auffällig ist allerdings, dass bei einem chelatierten Eisen-, Kupfer- oder Zink-Metallatom die maximale Absorptionsverschiebung bereits nach 270-370 s erreicht wurde wohingegen ohne Metall die Bindung spätestens nach 24 h abgeschlossen war. Dies könnte auf eine signifikante Beteiligung des Metallatoms an der Stabilisierung der Bindung an das aktive Zentrum hindeuten. In jedem Fall ist die Bindung von Substrat und der Substratanaloga nicht ausschließlich durch die Koordinierung des zentralen Metallatoms gegeben sondern vermutlich zusätzlich durch die spezifische Erkennung und Bindung der Seitenketten des Tetrapyrrols.

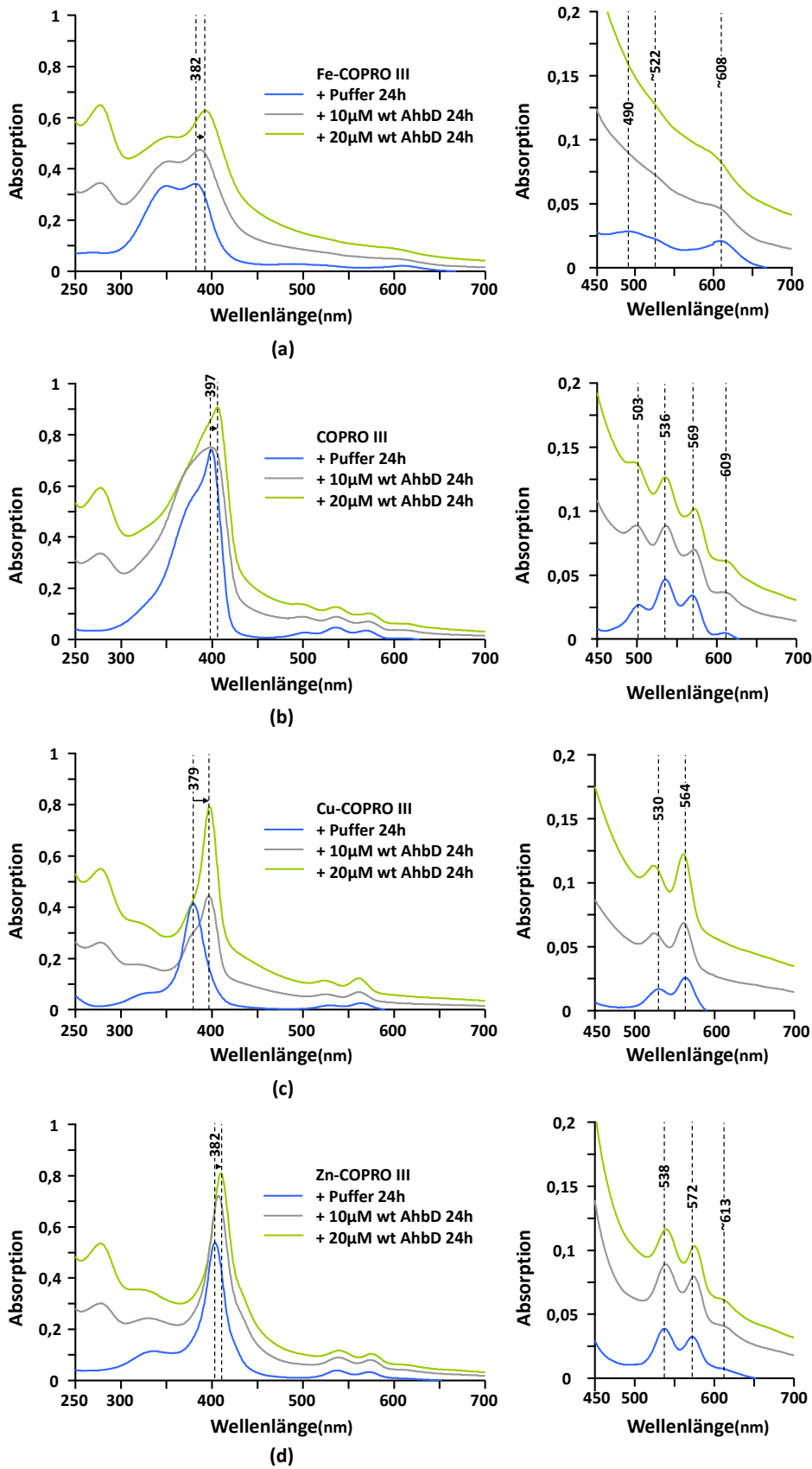


Abbildung 3.35: UV/Vis-Spektren der Substrat (-Analog)-Bindungsstudie mit wt AhbD. Dargestellt sind die UV/Vis-Spektren der Soret-Banden und Q-Banden von (a) Fe-Copro III, (b) Copro III, (c) Cu-Copro III sowie (d) Zn-Copro III nach Zugabe von wt AhbD nach 24 h Inkubationszeit. Das Substrat bzw. die Substratanaloga wurden jeweils als Negativ-Kontrolle in AhbD-Puffer vermessen.

3.5.2 SAM-Spaltungstests mit Substratanaloga

Da die Substratanaloga in der Lage waren an AhbD zu binden, wurde ein erneuter SAM-Spaltungstest von wt AhbD in Anwesenheit dieser Analoga zum einen mit Dithionit aber auch mit dem physiologischen Fd-Reduktionssystem durchgeführt (3.4.8). Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 17 °C wurden die Reaktionen gestoppt, das DOA extrahiert und mittels HPLC analysiert.

In den SAM-Spaltungstests mit dem starken Reduktionsmittel Dithionit konnte bei allen Ansätzen mit Substratanaloga DOA detektiert werden (Abbildung 3.36 (a)). Hierbei war der jeweils detektierte DOA-Peak in seiner Absorptionshöhe mit dem des Ansatzes mit Fe-Copro III vergleichbar (3.4.6). Lediglich in Anwesenheit von Zn-Copro III schien die Peak-Höhe des DOA vermindert zu sein. Um die Auswirkungen des physiologischen Ferredoxin-Reduktionssystems auf die SAM-Spaltung mit Substratanaloga zu testen, wurde analog ein weiterer Spaltungstest durchgeführt.

Auch unter diesen Bedingungen konnte für Copro III, Zn-Copro III als auch für Cu-Copro III eine Spaltung nachgewiesen werden, welche allerdings bei allen drei Analoga zu der gleichen Menge an detektiertem DOA führte (Abbildung 3.36 (b)). Unter der Verwendung des Fd-Reduktionssystems war die detektierte Menge des DOA im Vergleich zu einer Reduktion mit DT vermindert, was allerdings auch für Fe-Copro III der Fall war (3.4.6 und 3.4.9). Eine Ausnahme hiervon bildete das Zn-Copro III, dessen Anwesenheit bei der Verwendung beider Reduktionssysteme ähnliche DOA-Mengen aufwies. Dieser positiv ausgefallene SAM-Spaltungstest für die Substratanaloga bestätigte zusätzlich, dass diese Analoga an wt AhbD binden.

Da der SAM-Spaltungstest für alle Substratanaloga positiv ausfiel, wurde im Anschluss ein *in-vitro*-Enzymtest unter der jeweiligen Verwendung eines Substratanalogons durchgeführt, um zu klären ob eine Umsetzung zum jeweiligen Häm-Analogon erfolgt oder wie im Fall der Variante AhbD C321A/C324A nur eine SAM-Spaltung detektierbar war, jedoch das Substrat unter den gegebenen Bedingungen nicht zu Ende umgesetzt wurde (3.4.5 und 3.4.6).

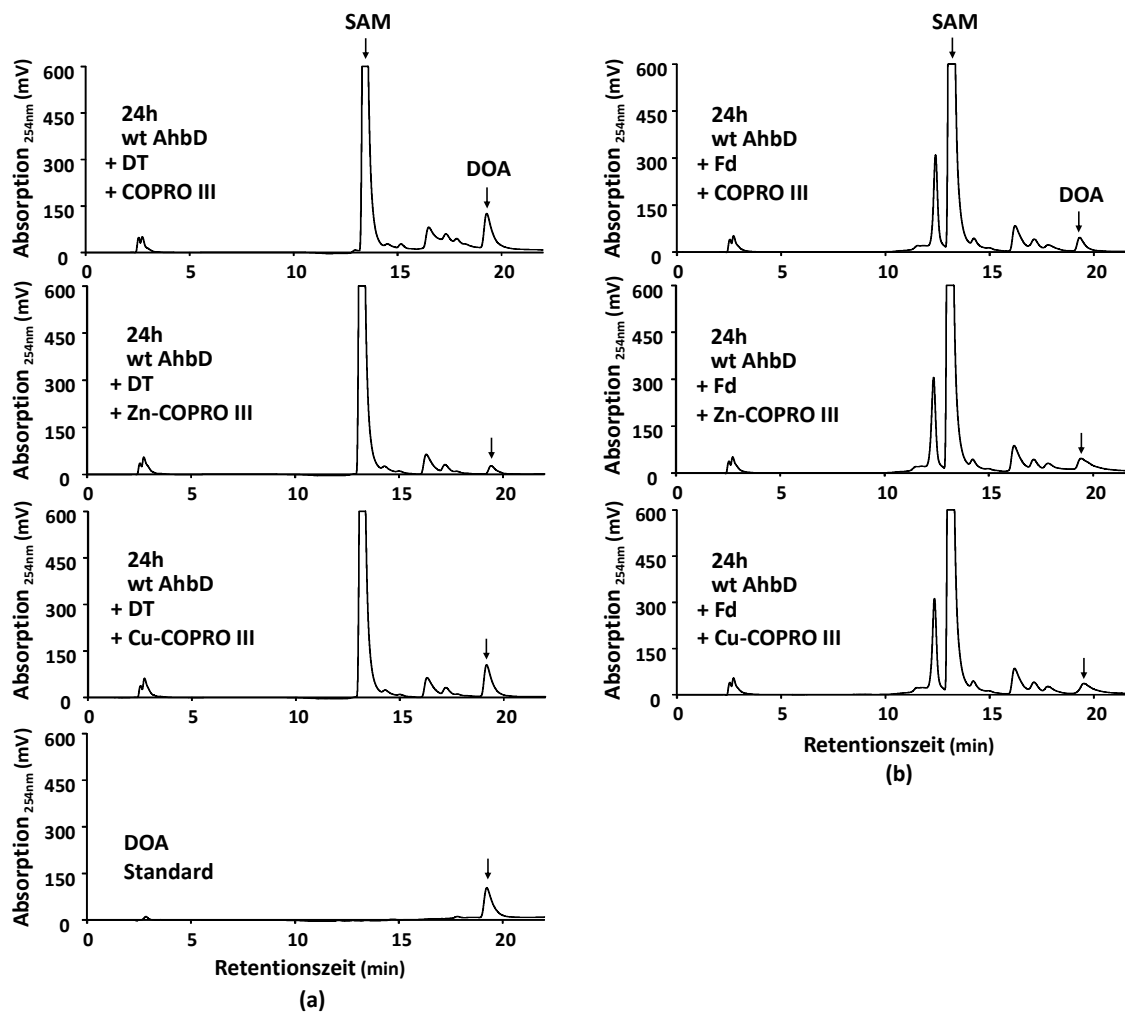


Abbildung 3.36: Chromatogramme der HPLC-Analyse der SAM-Spaltungstests von wt AhbD mit Substratanaloga. Das DOA der Spaltungstest-Ansätze mit 5 μM wt AhbD, 20 μM Copro III bzw. Zn-Copro III oder Cu-Copro III, 1 mM SAM sowie (a) 1 mM DT oder (b) mit dem Ferredoxin-Reduktionssystem, bestehend aus 5 mU FNR, 9 μM Fd und 0,6 mM NADPH, wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 $^{\circ}\text{C}$ analysiert. Die Spaltung von SAM konnte in allen Proben beobachtet werden, wobei die Anwesenheit von Zn-Copro III im Vergleich zu Copro III und Cu-Copro III anscheinend eine verminderte SAM-Spaltung durch wt AhbD aufwies.

3.5.3 *In-vitro*-Enzymtests mit Substratanaloga

Um zunächst die Umsetzung von Copro III durch AhbD zu testen, wurde ein *in-vitro*-Enzymtest durchgeführt, der analog zu einem Test mit Fe-Copro III als eigentliches Substrat von AhbD angesetzt wurde (3.3.6). Bei einer Umsetzung von Copro III durch AhbD müsste Proto IX als Reaktionsprodukt entstehen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 17 $^{\circ}\text{C}$ wurden die Reaktionen gestoppt, die Tetrapyrrole extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Das wt AhbD konnte nach 24 h Fe-Copro III komplett zu Monovinyl-Intermediat oder Häm umsetzen (Abbildung 3.37, oberes Chromatogramm). Im Ansatz mit Copro III als alleiniges Substrat wurde nach 24 h kaum eine Verminderung des Copro III-Peaks beobachtet, der auf Grund des fehlenden Eisen-Atoms in der Mitte seines Porphyringerüsts auch ein

Fluoreszenz-Signal aufwies. Es konnten jedoch im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle ohne AhbD zwei zusätzliche, fluoreszierende Peaks nach 24 h Inkubation ausgemacht werden (Abbildung 3.37, mittlere Chromatogramme). Ein Vergleich mit einer Proto IX-Standardlösung (Abbildung 3.37, unteres Chromatogramm) zeigte, dass AhbD in der Lage war geringe Mengen an Copro III zu Proto IX *in vitro* umzusetzen, wobei auch hier ein potentielles Monovinyl-Intermediat bei einer Retentionszeit von 34,5 min auszumachen war.

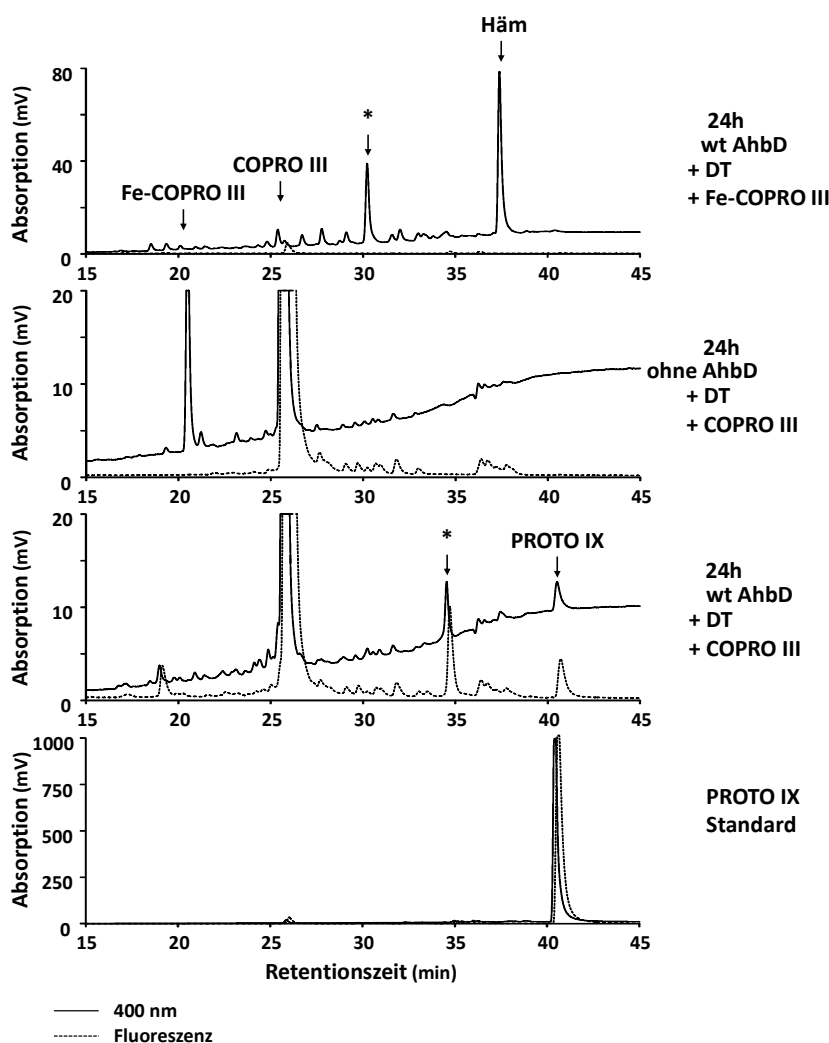


Abbildung 3.37: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von wt AhbD. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M wt AhbD oder ohne, 20 μ M Fe-Copro III bzw. Copro III, 500 μ M SAM sowie 1 mM DT als Reduktionsmittel wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. Als Vergleich diente die Analyse eines Proto IX-Standards. Im Vergleich zur kompletten Umsetzung des Fe-Copro III zu Monovinyl-Intermediat oder zu Häm (oberes Chromatogramm) konnte AhbD mit einer verminderten Umsetzungsrate ebenfalls Copro III zu einem Monovinyl-Intermediat als auch zu Proto XI umsetzen (untere Chromatogramme). (*): Monovinyl-Intermediate von Fe-Copro III und Copro III.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass für eine Umsetzung des Fe-Copro III durch AhbD das zentrale Eisenatom ggf. für eine vollständig ablaufende Enzymreaktion *in vitro* nötig sein könnte, indem es an einem Elektronentransport beteiligt ist. Beispielsweise könnte vom zentralen Eisenion des generierten Substrat-Radikals ein Elektron auf einen terminalen

Akzeptor bzw. auf das C-terminale Cluster transferiert werden. Falls das zentrale Eisenion tatsächlich an einem derartigen Elektronentransfer beteiligt wäre, müssten sich für das Zn- bzw. Cu-Analogon ebenfalls verminderte oder keine Umsatzraten ergeben.

Um den Einfluss dieser chelatierten Metallatome zu analysieren, wurde der *in-vitro*-Enzymtest mit Zn-Copro III und mit Cu-Copro III erneut durchgeführt und mit Copro III verglichen, wobei Dithionit sowie das Fd-Reduktionssystem eingesetzt wurden.

Unter den sauren Bedingungen, die während der HPLC-Probenvorbereitung herrschten, wurde Zn-Copro III demetalliert. In allen behandelten Proben mit Zn-Copro III wurden in den HPLC-Chromatogrammen daher entsprechende Peaks für Copro III detektiert (Abbildung 3.38). Der Verlust des zentralen Zinkatoms des Porphyrins wurde durch eine Veränderung in der Fluoreszenz deutlich, denn im Vergleich zu Porphyrinen, welche ein zentrales Eisenatom besitzen, sind mit Zink oder Magnesium chelatierte Porphyrine stark fluoreszierend (Lamola & Yamane, 1974). Ein Vergleich mit unbehandeltem Zn-Copro III-Standard zeigte, dass Zn-Copro III eine Retentionszeit von 23,2 min aufwies und sich im Standard keine Verunreinigung mit Copro III befand (Abbildung 3.39 (a)). Cu-Copro III zeigte wie Fe-Copro III keine Fluoreszenz. Obwohl die HPLC-Probenvorbereitung zur Demetallierung des Zn-Copro III führte, kann davon ausgegangen werden, dass im Enzymtest intaktes Zn-Copro III vorlag.

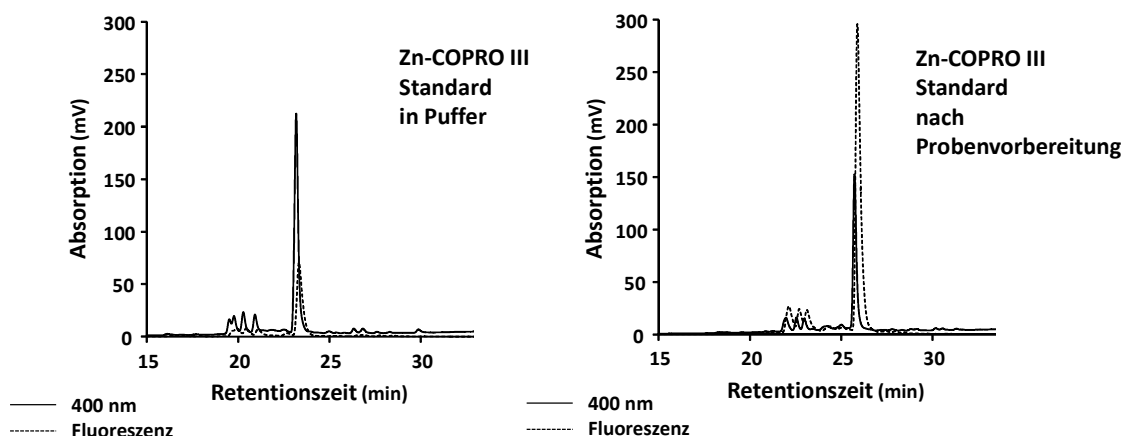


Abbildung 3.38: Chromatogramme der HPLC-Analyse des Zn-Copro III-Standards in Puffer sowie nach der Probenvorbereitung. Eine Veränderung im Fluoreszenz-Verhalten sowie in der Retentionszeit ist für behandeltes Zn-Copro III durch eine Demetallierung zu beobachten. Hierdurch wurde Zn-Copro III zu Copro III, welches eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Ausgangssubstanz aufweist.

Nach 24 h Inkubationszeit des Enzymtests konnte unter DT-Zugabe eine unvollständige Umsetzung des Zn-Copro III zu hauptsächlich Monovinyl-Intermediat als auch zu Zn-Protoporphyrin IX beobachtet werden (Detektion von Proto IX) (Abbildung 3.39 (a))

mittlere Chromatogramme). Bei Verwendung des Fd-Reduktionssystems konnte nach 24 h der Umsatz von Monovinyl-Intermediat zu dem resultierenden Zn-Proto IX gesteigert werden, was auch analog in der Umsetzung von Copro III beobachtet wurde (Abbildung 3.39 (b) mittlere Chromatogramme und oberes Chromatogramm). Auch Cu-Copro III konnte durch AhbD in Anwesenheit von DT zu Monovinyl-Intermediat (34,8 min) und zu einem potentiellen Cu-Proto IX (38,0 min) umgesetzt werden (Abbildung 3.39 (a) untere Chromatogramme). Während der Umsetzung zeigte sich hierbei das Auftreten eines Doppelpeaks des Cu-Copro III indem sich der bisherige Peak bei 29,9 min in zwei Peaks bei 29,5 min und 30,1 min aufspaltete. Überraschender Weise wurde in Anwesenheit des physiologischen Reduktionssystems kein Umsatz von Cu-Copro III detektiert (Abbildung 3.39 (b) untere Chromatogramme).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Substratanaloga Copro III, Zn-Copro III und Cu-Copro III durch AhbD umgesetzt wurden, allerdings geschah die Umsetzung nur in sehr geringem Maße, wenn man die Aktivität mit der in Anwesenheit von Fe-Copro III vergleicht. Diese Ergebnisse deuten in der Tat darauf hin, dass das zentrale Eisen eine Rolle als Elektronenüberträger während der Katalyse übernehmen könnte.

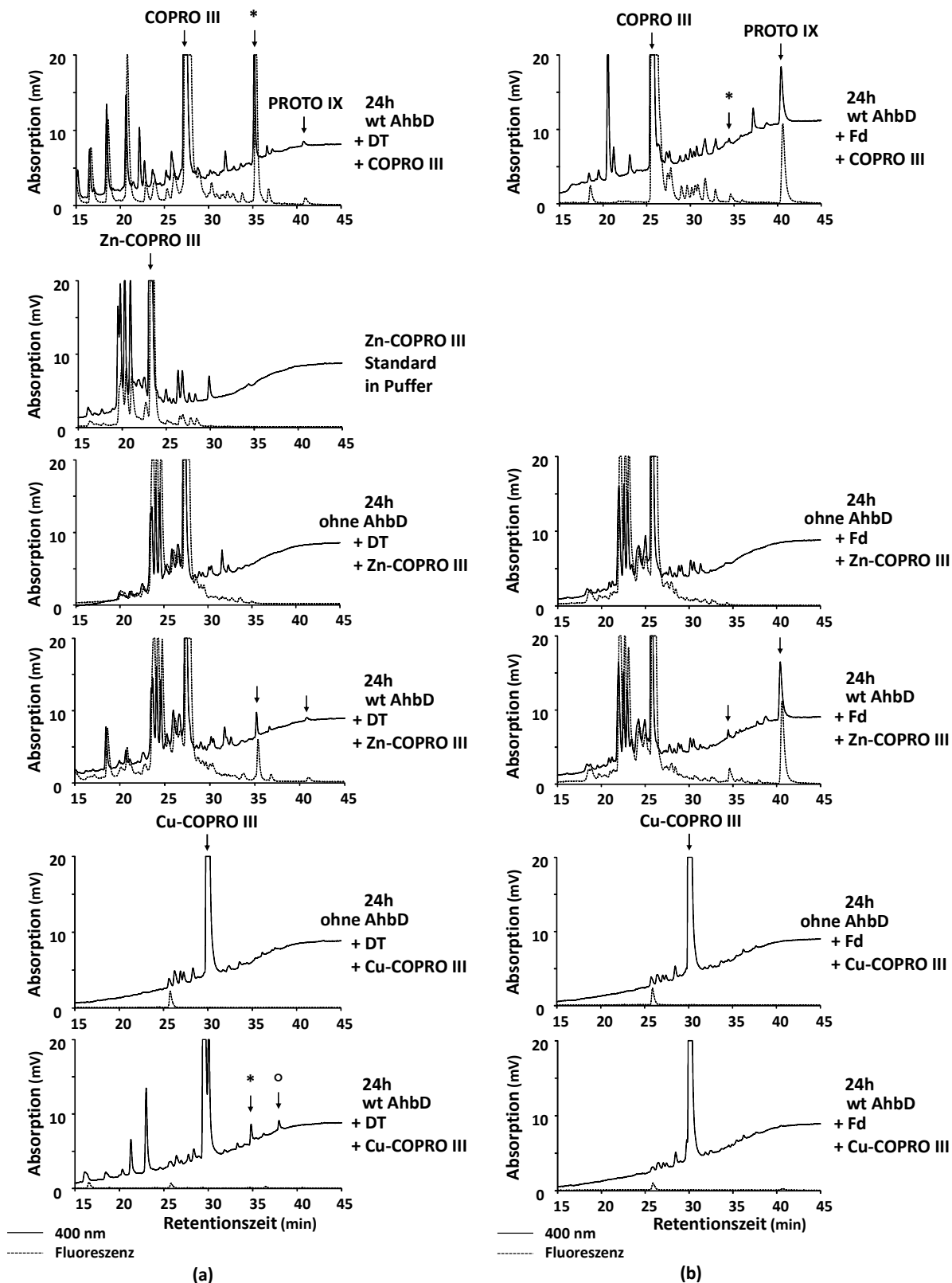


Abbildung 3.39: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von AhbD. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit 5 μ M wt AhbD oder ohne, 20 μ M Copro III bzw. Zn-Copro III oder Cu-Copro III, 1 mM SAM sowie (a) 1 mM DT oder (b) mit dem Ferredoxin-Reduktionssystem, bestehend aus 5 mU FNR, 9 μ M Fd und 0,6 mM NADPH, wurden nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. (a) Eine unvollständige Umsetzung des Zn-Copro III zu Monovinyl-Intermediat oder zu dem vermeintlichen Reaktionsprodukt Zn-Proto IX konnte nach 24 h ermittelt werden (mittlere Chromatogramme). Durch die Präparation der Proben vor HPLC-Auftrag ist chelatisiertes Zn aus dem Porphyringerüst demetalliert worden, was eine Zn-Copro III-Standardlösung in Puffer ohne Probenvorbereitung zeigt (zweites Chromatogramm). Das

Zn-Copro III kann somit nach Probenvorbereitung als Copro III sowie dessen Intermediat und Produkt als entsprechendes Monovinyl-Intermediat des Copro III als auch als Proto IX detektiert werden. Eine ebenfalls unvollständige Umsetzung von Cu-Copro III zu Monovinyl-Intermediat und Produkt konnte unter der Zugabe von DT beobachtet werden (untere Chromatogramme) analog zu einer Probe mit Copro III (oberes Chromatogramm). (b) Durch den Einsatz des Fd-Reduktionssystems konnte die Umsetzung von Copro III zu Proto IX (oberes Chromatogramm) als auch die Umsetzung von Zn-Copro III (mittlere Chromatogramme) gesteigert werden jedoch konnte auch hierbei nicht alles Substrat umgesetzt werden. Cu-Copro III konnten unter den gleichen Bedingungen nicht umgesetzt werden (untere Chromatogramme). (*): Monovinyl-Intermediate der jeweiligen Substratanaloga; (°):Cu-Protoporphyrin IX bzw. Produkt der Umsetzung von Cu-Copro III.

3.6 Folgestudien zu AhbD C321A/C324A und Cu-Copro III

Sowohl für wt AhbD in Anwesenheit von Cu-Copro III unter Zugabe des Fd-Reduktionssystems (3.5.2) als auch für AhbD C321A/C324A unter Anwesenheit von Fe-Copro III mit Zugabe von Dithionit erfolgte eine SAM-Spaltung (3.4.6) ohne dass im *in-vitro*-Enzymaktivitätstest ein Intermediat oder ein Produkt auszumachen war (3.4.5 und 3.5.3). Trotz erfolgreicher Generierung eines DOA-Radikals schien in beiden Fällen die enzymatische Umsetzung des jeweiligen Substrats inhibiert zu sein. Dies könnte zum einen dadurch geschehen, dass entweder (I) das DOA-Radikal mit einem Wasserstoffatom aus dem Puffer abreagiert, (II) das Substrat radikalisiert wird, jedoch ebenfalls mit dem Puffer abreagiert oder (III) dass das Substratradikal zunächst erfolgreich generiert und umgesetzt werden kann, sodass ein Monovinyl-Intermediat entsteht, die Reaktion aber nicht vollständig bis zum Endprodukt verläuft. Im letzteren Fall könnte das Intermediat ggf. weiterhin im Enzym verbleiben und dieses dadurch inhibieren. Die Konzentrationen des dabei gebildeten Intermediates wären hierbei womöglich zu gering um sie durch die verwendete HPLC-Analyse detektieren zu können.

Um auf diese Möglichkeiten zu testen, wurde der *in-vitro*-Enzymtest mit äquimolaren Mengen an Protein und Substrat durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden zur Untersuchung von AhbD C321A/C324A 20 µM des Substrats Fe-Copro III, 1 mM Cosubstrat SAM, 1 mM DT sowie 20 µM des Proteins in AhbD-Puffer eingesetzt. Im zweiten Ansatz sollte die Umsetzung von Cu-Copro III getestet werden, wofür 20 µM des Substrats Cu-Copro III, 1 mM Cosubstrat SAM, 5 mU FNR, 9 µM Fd, 0,6 mM NADPH sowie 20 µM des wt AhbD eingesetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 25 h bzw. 24 h bei 17 °C wurden die Tetrapyrrole nach dem Stoppen der Reaktion extrahiert und mittels HPLC analysiert.

Eine Negativ-Kontrolle mit erhöhter Menge an AhbD C19A/C23A zeigte wie erwartet nach 25 h keinerlei Umsetzung von Fe-Copro III, da bei den gegebenen Bedingungen keine SAM-Spaltung detektiert werden konnte (3.4.6). Es erfolgte ebenfalls keine Umsetzung von Copro III, welches in variierenden Mengen auch in der Fe-Copro III-Standardlösung

enthalten war (Abbildung 3.40 (a) oberes Chromatogramm). Für AhbD C321A/C324A konnte allerdings unter Verwendung von äquimolaren Mengen von Protein und Substrat unter der Zugabe von DT eine Aktivität ausgemacht werden, die sich auch in Anwesenheit beider AhbD-Varianten auf die Bildung des Monovinyl-Intermediats beschränkte (Abbildung 3.40 (a) untere Chromatogramme).

Auch äquimolare Mengen von wt AhbD in Kombination mit Cu-Copro III und physiologischem Reduktionssystem führten zur Detektion von geringen Mengen an Monovinyl-Intermediat, was ein Vergleich mit einer Negativ-Kontrolle ohne Protein sowie der positiven Reaktion mit DT zeigte (Abbildung 3.40 (b)).

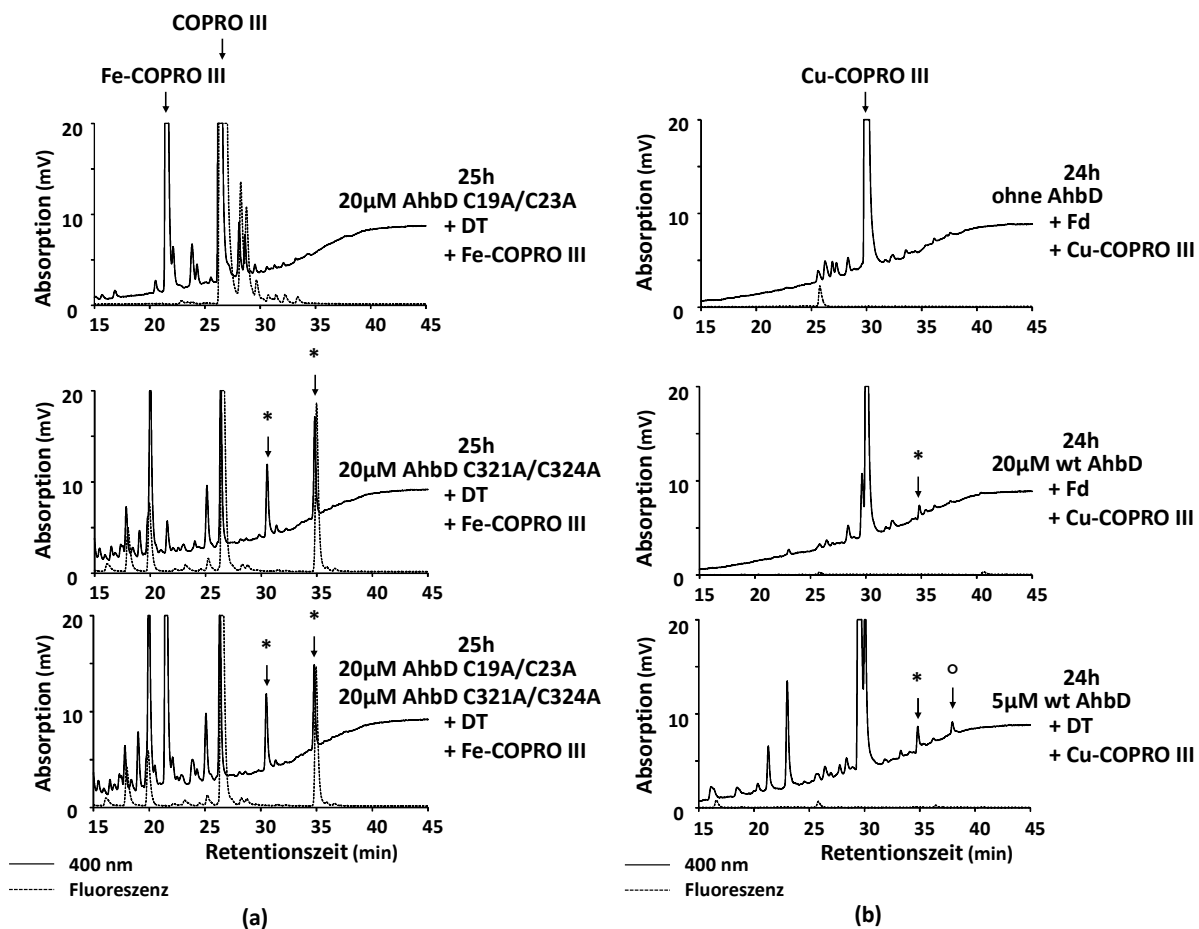


Abbildung 3.40: Chromatogramme der HPLC-Analyse des *in-vitro*-Enzymtests von 20 μ M AhbD mit Cu-Copro III und 20 μ M AhbD-Varianten mit Fe-Copro III. Die enthaltenen Tetrapyrrole der Enzymtest-Ansätze mit (a) 20 μ M AhbD C19A/C23A und/oder 20 μ M AhbD C321A/C324A, 20 μ M Fe-Copro III, 1 mM SAM und 1 mM DT oder der Ansätze mit (b) 0 μ M bzw. 20 μ M wt AhbD, 20 μ M Cu-Copro III, 5 mU FNR, 9 μ M Fd und 0,6 mM NADPH, wurden jeweils nach 24 h Inkubationszeit bei 17 °C analysiert. (a) Der Einsatz von äquimolaren Mengen an Fe-Copro III und AhbD C321A/C324A zeigte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle mit AhbD C21A/C23A (oberes Chromatogramm) nun die Bildung von Monovinyl-Intermediaten wobei kein Produkt-Peak beobachtet wurde. Auch die Anwesenheit beider AhbD-Varianten führte nicht zur Generierung von Häm (unteres Chromatogramm). (b) Der Einsatz von äquimolaren Mengen an Cu-Copro III und wt AhbD im Fd-Reduktionssystem führte zur Bildung von detektierbaren Mengen an Monovinyl-Intermediat (mittleres Chromatogramm), jedoch konnte ebenfalls kein Produkt-Peak beobachtet werden. Als Vergleich auf eine positive Reaktion diente hierbei die Inkubation von 5 μ M wt AhbD mit 20 μ M Cu-Copro III, 1 mM SAM und 1 mM DT (unteres Chromatogramm). (*): Monovinyl-Intermediate der jeweiligen Substratanaloga; (°): Cu-Protoporphyrin IX bzw. Produkt der Umsetzung von Cu-Copro III.

Die Ergebnisse (Tabelle 3.5) sprechen dafür, dass wie vermutet durch AhbD C321A/C324A nur das Intermediat der Reaktion gebildet werden kann. Das C-terminale Cluster, welches in dieser Variante fehlt, scheint also an einem Reaktionsschritt beteiligt zu sein, der ablaufen muss, damit die zweite Decarboxylierung ebenfalls stattfinden kann. Nicht nur das zusätzliche [4Fe-4S]-Cluster des AhbD sondern auch das Substrat selbst scheint durch sein chelatiertes Eisenion in dessen vollständiger Umsetzung involviert zu sein. Eine These wäre, dass sowohl das C-terminale Cluster als auch der Porphyrin-Ring des Substrats sowie dessen zentrales Metallatom am Elektronentransfer beteiligt sind. Ein potentieller Elektronentransfer könnte über das π -Elektronensystem des Porphyringerüsts zum zentralen Fe^{3+} führen, das transient zu Fe^{2+} reduziert wird, und dann ggf. weiter über spezifische AS-Reste des AhbD zum C-terminalen Cluster, von wo das Elektron letztendlich an einen externen Elektronen-Akzeptor weitergeleitet werden könnte. Durch das Ausschleusen des Elektrons wäre dann die Modifizierung der zweiten Propionatgruppe auf die gleiche Weise möglich. In der AhbD-Variante ohne C-terminales Cluster wäre ein entsprechender Weitertransport des Elektrons unterbunden, das Monovinyl-Intermediat bliebe in seiner Fe^{2+} -Form und es käme nur zur Umsetzung einer Propionatgruppe.

Nach dieser Hypothese würde auch ein Substratanalogon ohne entsprechendes Metallzentrum oder mit einem chelatierten Metall mit sehr viel niedrigerem Redox-Potential als das des N-terminalen Clusters oder höherem als das des C-terminalen Clusters einen vollständigen Transfer der Elektronen und damit die komplette Reaktion unterbinden. Metalloporphyrine mit den chelatierten Übergangsmetallen Cu^{2+} oder Fe^{2+} sind durch die reversible Veränderung ihres Oxidationsstatus metabolisch signifikant (Maines & Kappas, 1977). Im Vergleich zu Kupfer ist Zink nicht in der Lage seine Oxidationsstufe zu verändern, wodurch eigentlich ein Transfer von Elektronen über Zink unterbunden sein müsste und wie im Fall des Copro III eine Umsetzung nur durch den Elektronentransfer über das Porphyringerüst ablaufen könnte.

Zusätzliche Messungen über zyklische Voltammetrie zeigten, dass sowohl das Substratanalogon mit chelatiertem Kupfer als auch Zink redox-inert für die ablaufenden Reaktionen mit AhbD sind (Anhang, Abbildung I (d)). In der Tat zeigen Potentialmessungen von Cu-Porphyrin IX-Dimethylester, dass das Halbstufenpotential von Cu mit -1330 mV/-1760 mV sowie -1370 mV/-1820 mV in einem vergleichbaren Porphyringerüst viel zu niedrig ist, als dass es ein Elektron aufnehmen könnte (Kakutani & Senda, 1973; Kakutani *et al.*, 1973).

Tabelle 3.5: Übersicht der SAM-Spaltungsergebnisse in der Anwesenheit von Substrat (-Analoga) sowie deren Umsetzung durch AhbD sowie AhbD C321A/C324A nach 24 h. Wt AhbD ist in der Lage in Anwesenheit jedes der aufgeführten Analoga SAM zu spalten und dieses umzusetzen. Im Vergleich zum eigentlichen Substrat Fe-Copro III ist die Umsatzrate allerdings geringer. (max.): positiv mit maximaler Spaltung oder kompletter Umsetzung; (+++): positiv; (++): positiv, jedoch vermindert; (+) positiv, jedoch stark vermindert; (-): negativ; (-/+): negativ, jedoch unter Zugabe äquimolarer Proteinmengen zum Substrat (-Analogon) Monovinyl-Detektion.

	SAM-Spaltung						
	Fe-COPRO III	COPRO III	Cu-COPRO III	Zn-COPRO III	ohne		
wt AhbD (+ DT)	max.	max.	max.	max.	-	AhbD C321A/C324A (+ DT)	max.
wt AhbD (+ Fd)	+++	+++	+++	+++	-	AhbD C321A/C324A (+ Fd)	-
	Umsetzung von Substrat (-Analogon)						
	Fe-COPRO III	COPRO III	Cu-COPRO III	Zn-COPRO III	ohne		
wt AhbD (+ DT)	max.	+	+	+	-	AhbD C321A/C324A (+ DT)	-/+
wt AhbD (+ Fd)	max.	++	-/+	++	-	AhbD C321A/C324A (+ Fd)	-

Die exakte Funktion des C-terminalen Clusters scheint trotz der modifizierten *in-vitro*-Enzymtests noch nicht vollständig gelöst, jedoch können einige der für zusätzliche Cluster möglichen Funktionen ausgeschlossen werden (Tabelle 3.6). Eine rein strukturelle Funktion des C-terminalen Clusters, welche bei Abwesenheit zu einer drastischen Veränderung der Proteinstruktur führen würde, ist unwahrscheinlich, da die AhbD-Variante AhbD C321A/C324A, welche kein C-terminales Cluster mehr binden kann, löslich vorlag und somit problemlos gereinigt werden konnte (3.4.2). Wie auch für das Fe-Copro III wäre es jedoch durchaus denkbar, dass das C-terminale Cluster die Konformation des aktiven Zentrums beeinflussen könnte. Eine Möglichkeit hierbei wäre, dass AhbD mit oxidiert vorliegendem Cluster die Bindung des Fe-Copro III ermöglicht, sodass eine der beiden Propionatgruppen C3 oder C8 modifiziert werden kann.

Tabelle 3.6: Übersicht der möglichen Funktionen des zusätzlichen C-terminalen [4Fe-4S]-Clusters in AhbD aus *M. barkeri*.

Funktion des zusätzlichen C-terminalen Clusters	Schlussfolgerung		Beispiele
SAM-Spaltung	negativ	diese Arbeit	-
Substratbindung	negativ	diese Arbeit	BioB (Ugulava <i>et al.</i> , 2003); MoaA (Hänzelmann <i>et al.</i> , 2004)
Strukturelle Stabilität	unwahrscheinlich	Varianten sind löslich & gut zu reinigen	MoaA (Hänzelmann <i>et al.</i> , 2004)
Modifizierung des aktiven Zentrums	möglich	-	-
Schwefel-Donor	negativ	wird in Reaktion nicht benötigt	BioB (Cosper <i>et al.</i> , 2004)
Eisen-/Schwefelerkennung	unwahrscheinlich	-	HydG & HydE postuliert (Nicolet <i>et al.</i> , 2008)
Elektronentransfer/ Katalyse	wahrscheinlich	Cluster kann mit DT reduziert werden; erste Reaktion läuft ab, die zweite nicht	MoaA (Hänzelmann <i>et al.</i> , 2004)

Die Postulierung eines potentiellen Reaktionsmechanismus für AhbD ist hauptsächlich auf die erste radikalische Reaktion beschränkt, da es noch zu viele offene Fragen bezüglich des genauen Elektronentransfers und der genauen Umsetzung des Fe-Copro III gibt.

Durch die Reduktion des N-terminalen Clusters über einen externen Elektronen-Donor kann dieses ein Elektron auf das SAM-Molekül transferieren, wodurch das SAM in Methionin und ein DOA-Radikal gespalten wird (Abbildung 3.41 (1. SAM-Spaltung)). Durch diese für RS-Enzyme typische Reaktion, kann das DOA-Radikal ein Wasserstoffatom der zu modifizierenden Propionatgruppe abstrahieren, wodurch es zu 5'-Deoxyadenosin reagiert und das Substrat radikalisiert. Die Modifizierung der Propionatgruppe zu einer Vinylgruppe erfolgt vermutlich durch die AhbD-katalysierte Abspaltung eines CO₂-Moleküls (Abbildung 3.41 (2. Generierung des MVI)). Das durch die Reaktion frei werdende Elektron wird vermutlich zunächst durch das im Substrat chelatierte Eisenion und dann über das C-terminale Cluster an einen externen Elektronen-Akzeptor weitergeleitet, sodass das chelatierte Eisen in der zweiten Reaktion erneut ein Elektron aus der Reaktion aufnehmen und abtransportieren könnte um letztendlich Häm zu bilden.

1. SAM-Spaltung

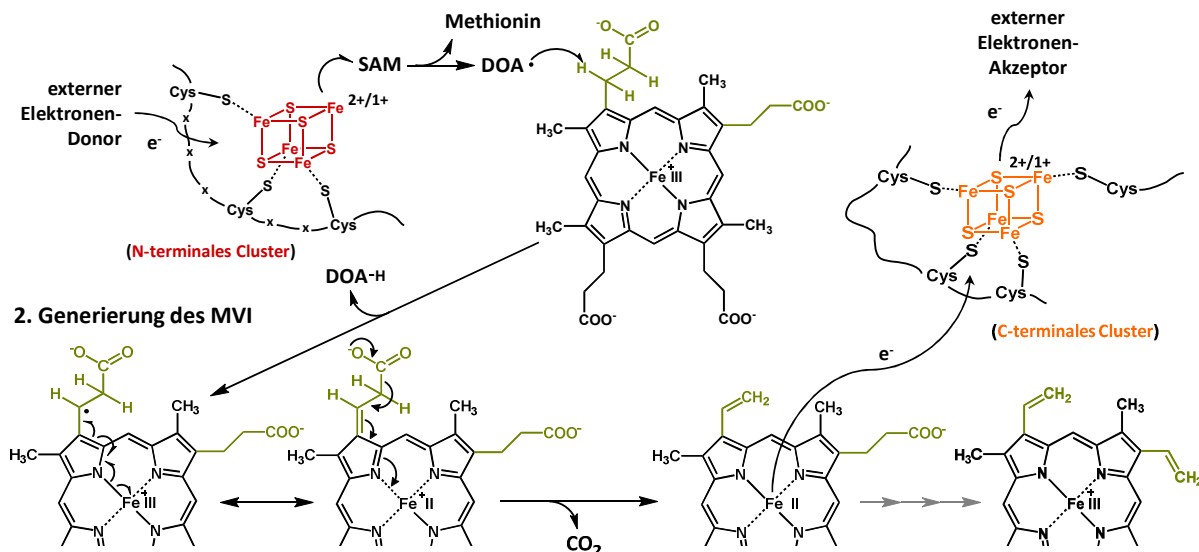


Abbildung 3.41: Schema des potentiellen Reaktionsmechanismus des AhbD aus *M. barkeri*. (1.) Ein externer Elektronen-Donor wie z.B. Ferredoxin reduziert das N-terminale Cluster von $[4Fe-4S]^{2+}$ zu $[4Fe-4S]^{1+}$, wodurch es in der Lage ist durch einen Elektronentransfer ein gebundenes SAM-Molekül in Anwesenheit des Substrats Fe-Copro III zu spalten. Das daraus resultierende DOA-Radikal abstrahiert ein Wasserstoffatom einer der umzusetzenden Propionatgruppen des Fe-Copro III (hier am Beispiel des C3-Rests). (2.) Das radikalisierte Fe-Copro III überträgt das zurückgebliebene Elektron an das zentrale Eisenatom. Durch diese Umlagerung der Elektronen wird ein CO_2 -Molekül von der besagten Propionatgruppe abgespalten, was zur Generierung des Monovinyl-Intermediats führt (MVI). Einhergehend mit dieser Reaktion ist ein Elektronentransfer vom zentralen Eisenatom zum C-terminalen Cluster, welches dieses an einen externen Elektronen-Akzeptor weiterleitet, damit schließlich die zweite Propionatgruppe modifiziert und Häm generiert werden kann. (grün): (modifizierte) Propionatgruppen an Position C3 und C8; (rot): N-terminales $[4Fe-4S]$ -Cluster; (orange): C-terminales $[4Fe-4S]$ -Cluster.

In zukünftigen Studien müsste dieser postulierte Mechanismus natürlich weiter untersucht werden. So wäre es z.B. wichtig zu zeigen, dass das Monovinyl-Intermediat, welches in der AhbD C321A/C324A-Variante gebildet wird, tatsächlich im reduzierten Fe(II)-Zustand vorliegt. Weiterhin könnten strukturelle Untersuchungen dabei helfen den Katalysemechanismus besser zu verstehen. Daher wurden in dieser Arbeit erste Kristallisationsversuche mit AhbD unternommen.

3.7 Kristallisation von AhbD

3.7.1 Reinigung von AhbD aus *M. sedula* mit N-terminalem His-Tag

Um durch Generierung und Vermessung von Proteinkristallen Rückschlüsse auf den potentiellen Reaktionsmechanismus von AhbD ziehen zu können, sollten erste Kristallisations-Ansätze mit dem AhbD-Homolog aus dem thermophilen Archaeon *Metallosphaera sedula* durchgeführt werden.

Die rekombinante Produktion von AhbD aus *M. sedula* erfolgte analog zu AhbD aus *M. barkeri* mit N-terminalem His-Tag aerob in *E. coli* BL21(DE3) unter der Verwendung des Plasmids pETDuet_1_nirJ1_msed (2.4.12). Da *M. sedula* ein Wachstumsoptimum von 65 °C besitzt, wurde zur Erzielung einer erhöhten Reinheit von AhbD ein Hitzeschock der aus der Ultrazentrifugation gewonnenen Proteinlösung bei 65 °C durchgeführt. Die ebenfalls im zellfreien Extrakt enthaltenen *E. coli*-Proteine sollten durch diese Methode ab 42 °C bereits denaturiert werden ohne das AhbD des thermophilen Archaeons zu beschädigen. Ein aus 3 L *E. coli*-Zellkultur gewonnener zellfreier Extrakt wurde nach der Behandlung mit Ultraschall zu gleichen Teilen aufgeteilt und entweder für 15 min auf Eis oder bei 65 °C inkubiert. Denaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und AhbD aus dem klaren Überstand über eine IMAC gereinigt.

Auch AhbD aus *M. sedula* konnte analog zu AhbD aus *M. barkeri* (3.3.4) erfolgreich mit N-terminalem His-Tag produziert und gereinigt werden, da sich insgesamt in den Elutionsfraktionen E2-E8 vergleichbare Proteinmengen des Proteins befanden (Abbildung 3.42). Hauptsächlich in E2 zeigte sich eine deutliche Verunreinigung mit nieder- und höhermolekularen Proteinen. Eine vorherige Inkubation der Proteine bei 65 °C führte zu einem drastischen Verlust von AhbD (Abbildung 3.43). Obwohl dieser Schritt eine Erhöhung der Proteinreinheit erzielen sollte, wurden vor allem niedermolekulare Banden auf dem Gel detektiert, welche vermutlich auch aus einer Degradation des AhbD entstanden sein könnten. Es wurden die Elutionsfraktionen E2-E8 für die auf Eis inkubierte Probe sowie E2-E5 der mit 65 °C-behandelten Probe separat vereinigt und das jeweils enthaltene Imidazol durch einen Pufferwechsel entfernt (2.4.4). Insgesamt konnten aus 1,5 L-Zellkultur durch die herkömmliche Reinigungsmethode 97 mg Protein gereinigt werden, bei Verwendung des Hitzeschocks bei 65 °C lediglich 15 mg AhbD, was einen 6-fachen Verlust der Proteinmenge darstellt. Für eine Wiederholung einer Reinigung unter Verwendung höherer Temperaturen, sollte die Zeitspanne zur Denaturierung der *E. coli*-Proteine geringer ausfallen.



Abbildung 3.42: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Reinigung über IMAC nach Inkubation auf Eis (Ni-NTA-Agarose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen während der Reinigung zur Ermittlung der AhbD-beinhaltenen Elutionsfraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (M): Unstained Protein MW Marker; (D): Proteine im Säulen-Durchlauf; (W): Proteine in der Wasch-Fraktion; (E1-E8): Proteine der Elutionsfraktionen 1-8 von je 2 mL.

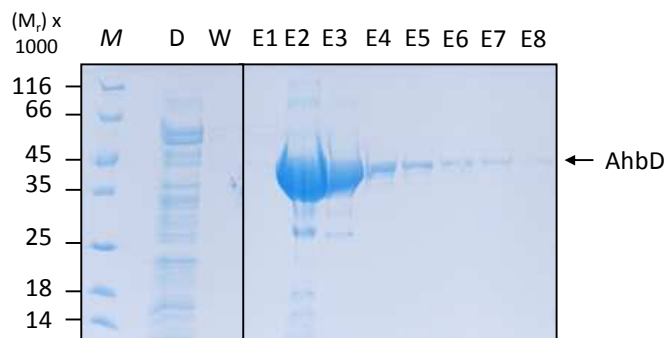
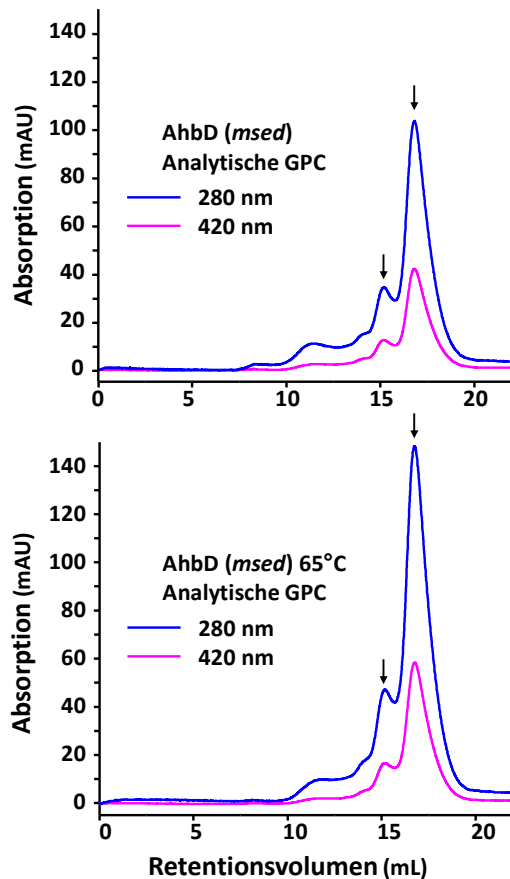


Abbildung 3.43: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Reinigung über IMAC nach 65 °C-Erhitzung (Ni-NTA-Agarose), Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen während der Reinigung zur Ermittlung der AhbD-beinhaltenen Elutionsfraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (M): Unstained Protein MW Marker; (D): Proteine im Säulen-Durchlauf; (W): Proteine in der Wasch-Fraktion; (E1-E8): Proteine der Elutionsfraktionen 1-8 von je 2 mL.

Zur Untersuchung des Oligomerisierungszustandes von AhbD in den beiden unterschiedlichen AhbD-Lösungen wurde nach deren separater Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster (2.4.16) eine analytische GPC durchgeführt (2.4.7), die wie zur Analyse des AhbD aus *M. barkeri* über eine 24 mL Superdex™ 200 10/300 GL-Säule erfolgte. Auch hier zeigte sich in beiden AhbD-Proteinlösungen, dass AhbD im verwendeten AhbD-Puffer hauptsächlich als Monomer vorlag und eine Erhitzung auf 65 °C keinen Effekt auf den Oligomerisierungszustand ausübte (Abbildung 3.44). Die leicht abweichenden Werte für das molekulare Gewicht von AhbD aus *M. sedula*, welches wie AhbD aus *M. barkeri* ein berechnetes Gewicht von 38.600 Da besitzt, resultierten aus der Verwendung der Eichgeraden für AhbD aus *M. barkeri*, welche für diesen Versuch nicht erneut komplett aufgenommen wurde.



(a)

Retentionsvolumen V_r (mL)	$x = V_r/V_0$ (mL)	$e^y =$ ermitteltes MW (kDa)	AhbD His-Tag (kDa)
16,79	2,00	27,6	Monomer (38,6)
15,19	1,81	56,9	Dimer (77,2)

Retentionsvolumen V_r (mL)	$x = V_r/V_0$ (mL)	$e^y =$ ermitteltes MW (kDa)	AhbD 65°C His-Tag (kDa)
16,73	1,99	28,7	Monomer (38,6)
15,20	1,81	56,9	Dimer (77,2)

(b)

Abbildung 3.44: Bestimmung des Oligomerisierungszustandes von AhbD mit His-Tag.

(a) Chromatogramme der analytischen GPC des gereinigten und rekonstituierten AhbD aus *M. sedula* durch eine herkömmliche Reinigung mit zwischenzeitlicher Inkubation auf Eis (oben) bzw. einer Inkubation von 65 °C für 15 min (unten). Die Elution erfolgte in beiden Fällen in zwei distinkten Peaks (Pfeile). (b) Die Berechnung des zugehörigen molekularen Gewichts ergab, dass neben einer dimeren Form, AhbD aus *M. sedula* vor allem als Monomer vorlag. Das Leervolumen V_0 betrug 8,412 mL, welches durch den Proteinstandard Blue Dextran ermittelt werden konnte.

Da für die Kristallisation reines und monomeres AhbD benötigt wird, wurde die Proteinreinheit durch einen zweiten Reinigungsschritt über eine präparative GPC optimiert (2.4.7). Die AhbD-Proteinlösung, welche ohne Hitzeschock bei 65 °C gereinigt worden war, wurde hierbei auf eine 120 mL HiLoad™ 16/60 Superdex™ 200pg-Säule aufgetragen um die verschiedenen Oligomerisierungszustände voneinander zu separieren.

Das resultierende Chromatogramm zeigte Elutions-Peaks analog zu denen der analytischen GPC mit der höchsten Absorption des Monomer-Peaks des AhbD (Abbildung 3.45). Monomer- und Dimer-Peak des AhbD zeigten allerdings keine distinkten Peaks sondern gingen direkt fließend ineinander über. Anhand einer anschließenden SDS-PAGE-Analyse (2.4.3) konnte die Reinheit des erhaltenen AhbD ermittelt werden, jedoch konnten keine Rückschlüsse auf die Anwesenheit von monomerem oder dimerem Protein gezogen werden

(Abbildung 3.46). Die Fraktionen 21-25 wurden vereinigt um sicherzustellen, dass AhbD nur als Monomer in der Lösung vorlag.

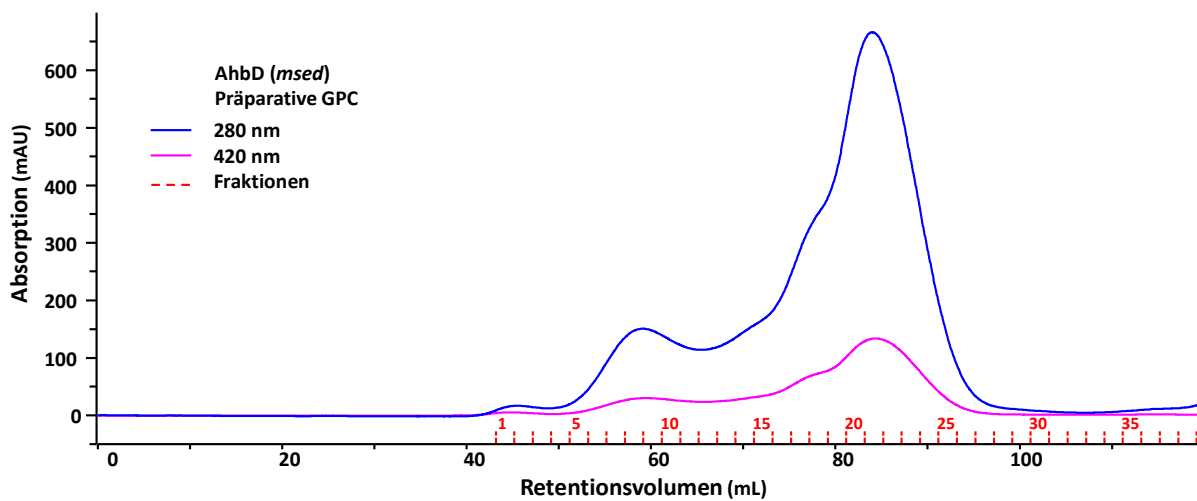


Abbildung 3.45: Chromatogramm der AhbD-Proteinreinigung über präparative GPC am Äkta™ Purifier. Es eluierten zwei distinkte Protein-Peaks sowie eine Protein-Schulter, welche sowohl bei 280 nm als auch bei 420 nm eine Absorption aufwiesen und vermutlich eine Oligomerisierung des AhbD aus *M. sedula* repräsentierten.

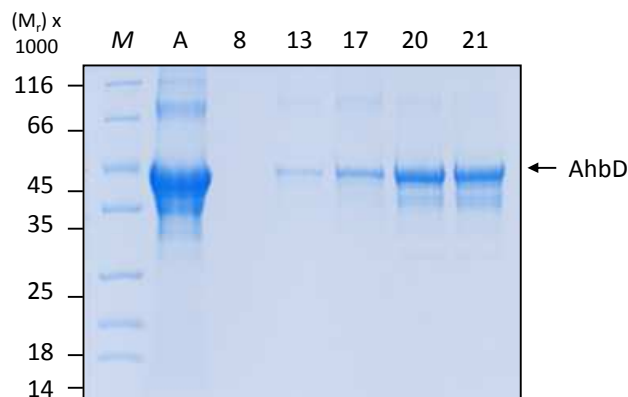


Abbildung 3.46: SDS-PAGE-Analyse der AhbD-Reinigung über präparative GPC, Coomassie®-Färbung. Aufgetragen sind Proben der Fraktionen vor und während der Reinigung zur Ermittlung der AhbD-beihaltenden Elutionsfraktionen und deren Reinheit. AhbD mit einer relativen molekularen Masse von 38.600 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. (M): Unstained Protein MW Marker; (A): Proteine im Säulen-Auftrag; (8-21): Proteine der Fraktionen 8-21 von je 2 mL.

Das monomere AhbD wurde im Anschluss an die GPC erneut rekonstituiert um ggf. einen potentiellen Verlust von Eisen-Schwefel-Clustern auszuschließen. Der letzte Schritt der Rekonstitution erfolgte mit einem zeitgleichen Pufferwechsel zu Krist-Puffer, der anders als der bisher eingesetzte AhbD-Puffer vor allem eine geringere Salzkonzentration besaß um eine Bildung von Salzkristallen zu vermeiden.

3.7.2 Kristallisations-Screens von AhbD aus *M. sedula* mit Fe-Copro III

Das gereinigte, monomere AhbD wurde konzentriert (2.4.6) um zwei verschiedene Proteinlösungen generieren zu können. Die erste Lösung besaß eine Endkonzentration von 288 μM AhbD (11,1 mg/mL) und 5 mM SAM in Krist-Puffer wohingegen die zweite zusätzlich 330 μM des Substrats Fe Copro III enthielt. Die ersten Kristallisations-Ansätze wurden durch den Einsatz von Kristallisations-Kits durchgeführt (2.4.22). Es wurden jeweils 100 μL der verschiedenen Puffer der Kits in ein Reservoir vorgelegt und anaerobisiert. Für die Kristallisationsversuche wurde die *sitting-drop-vapor*-Diffusionsmethode angewandt, wobei 1 μL der jeweiligen Protein-Substrat-Lösung mit 1 μL des entsprechenden Puffers gemischt und luftdicht bei 17 °C inkubiert wurde.

Nach maximal einem Monat Inkubation wurden die Kristallisations-Platten mikroskopisch betrachtet. Die Ansätze der Kristallisations-Kits NeXtal Tubes JCSG Core I Suite und NeXtal Tubes JCSG Core II Suite wiesen keine kristallinen Strukturen auf sondern meist ausgefallenes bzw. aggregiertes Protein und wurden verworfen (Daten nicht gezeigt). In der Platte des NeXtal Tubes Cryos Suite-Kits war ebenfalls viel Protein ausgefallen, jedoch zeigten sich in den Puffern 54 (Reservoir E6) und 55 (Reservoir E7) (Tabelle 3.7) kristallähnliche bräunliche Gebilde, was auf die Bildung von [Fe-S]-haltigen Proteinkristallen schließen ließ. Während bei Puffer 55 viele kleinere Kristall-Vorstrukturen beobachtet werden konnten (Abbildung 3.47 (b)), bildeten sich in Puffer 54 drei größere hexagonale kristalline Strukturen (Abbildung 3.47 (a)), welche allerdings bei der Vermessung in einem Röntgengenerator keine auswertbaren Daten liefern konnten (Daten nicht gezeigt). Diese beiden Bedingungen könnten jedoch ein Ausgangspunkt für folgende Kristallisationsversuche sein.

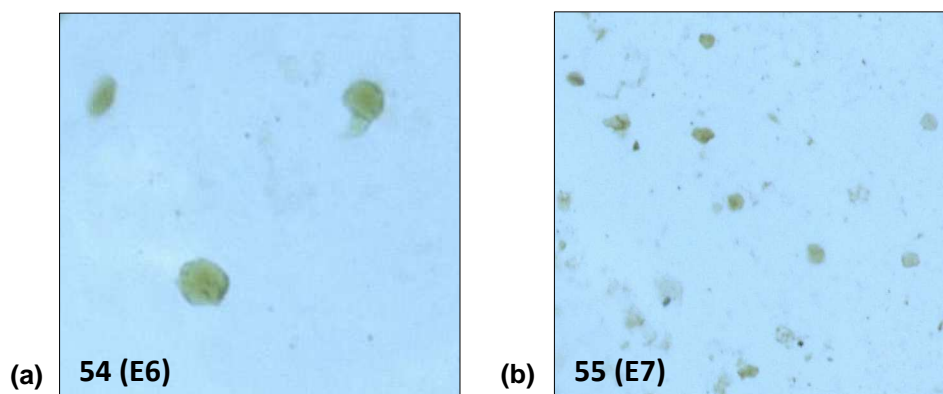


Abbildung 3.47: Mikroskopische Aufnahmen der *sitting-drop*-Ansätze aus dem NeXtal Tubes Cryos Suite-Kit. (a) Drei hexagonale kristalline Strukturen in Puffer 54 sowie (b) mehrere kleinere kristalline Gebilde in Puffer 55, Aufgenommen nach einem Monat Inkubationszeit. (AhbD: 288 μM ; SAM: 5 mM; Fe-Copro III: 330 μM).

Tabelle 3.7: Übersicht der Zusammensetzung der Kristallisations-Puffer 54 und 55 des NeXtal Tubes Cryos Suite-Kits.

Nr.	Well	Salz Nr.1	Salz Nr.2	Puffer	Fällungsmittel	Cryo-Schutz
54	E6	425 mM Natriumchlorid	85 mM Magnesiumchlorid	-	8,5 mM CTAB	15% (v/v) Glycerin
55	E7	8,5 mM Eisenchlorid	-	85 mM Trinatriumcitrat (pH 5,6)	8,5% (v/v) Jeffamine M-600	15% (v/v) Glycerin

3.7.3 Strukturelle Vorhersage für AhbD aus *M. barkeri*

Da die ersten Kristallisations-Ansätze für AhbD aus *M. sedula* keine auswertbaren Daten zur Bestimmung der Struktur liefern konnten, wurde eine potentielle Struktur des AhbD aus *M. barkeri* durch die 3D Proteinstruktur-Vorhersage-Software I-Tasser generiert (2.6). Hierbei wurde als Vorlage neben MoaA (1tv7A) unter anderem anSMecpe (4k36A) und HemN (1oltA) von den bisher in der Proteindatenbank (PDB) verfügbaren Proteinen als potentielle strukturelle Analoge ermittelt.

Ähnliche Molekül-Bindestellen konnten in den Proteinen MoaA (2fb3A) und RlmN (3rfaA und 1tv7A) ausgemacht werden, wobei als Vorlage für ein Modelling RlmN verwendet wurde, da es erfolgreich mit SAM co-kristallisiert werden konnte (Boal *et al.*, 2011) und Übereinstimmungen zu AhbD lieferte. Ebenso wie das Protein Cfr methyliert RlmN die Positionen C2 und C8 von Adenosin 2503 in der 23S rRNA. Für das Modellieren ist zudem interessant, dass RlmN wie AhbD für eine erfolgreiche SAM-Spaltung die Anwesenheit seines Substrats benötigt (3.4.6).

Das generierte Modell zeigte, dass AhbD aus einer abwechselnden Anordnung von α -Helices sowie insgesamt acht β -Faltsträngen zu bestehen scheint und wie andere RS-Enzyme dadurch ein TIM-barrelähnliches, strukturelles Zentrum enthält (Abbildung 3.48 (a,b)). Dieses Zentrum besteht bei HemN sowie bei MoaA aus sechs β/α -Wiederholungen sowie bei BioB aus acht (Layer *et al.*, 2005). In AhbD konnten nur vier solcher Wiederholungen im Modell ausgemacht werden, da diese oft durch eine zusätzliche α -Helix oder einen β -Faltstrang unterbrochen werden. Das N-terminale Cluster befand sich im Modell am Ende des β -Faltblatt-Barrels und deutete durch seine Zugänglichkeit von außen auf ein aktives Zentrum zur Bindung von SAM und Fe-Copro III hin (Abbildung 3.48 (c)). Eine mögliche Substrat-Bindetasche wurde auch für die Struktur von AhbD aus *D. vulgaris* postuliert, welche ebenfalls nur durch die Generierung von einem Modell nach anSMecpe durch I-Tasser postuliert werden konnte (Lobo *et al.*, 2014). Das C-terminale Cluster in AhbD aus *M. barkeri*

wurde mit den Cysteinen 312, 315, 321 und 342 als Liganden durch *pair-fitting* manuell in das Modell gelegt und befand sich am Rande der Proteinstruktur. Durch das ähnliche Bindemotiv in anSMecpe wird vermutet, dass diese Cysteine das Cluster koordinieren (3.3.2). *In-vitro*-Enzymtests mit Einzelcystein-Varianten, deren codierende Plasmide in dieser Arbeit aufgeführt sind, wurden von Nils Birkholz innerhalb seiner Bachelorarbeit durchgeführt, um die Bedeutung der einzelnen Cysteine zu untersuchen. Die Varianten AhbD C312A, AhbD C315A, AhbD C321A sowie AhbD C342A konnten unter Verwendung von Dithionit nach 24 h Fe-Copro III zu Monovinyl-Intermediat sowie Häm umsetzen (Daten nicht gezeigt). Interessanter Weise konnte eine deutliche Verminderung der Aktivität der Variante AhbD C324A beobachtet werden, da nach 24 h noch Substrat in der Lösung vorhanden war und nur ein geringer Monovinyl-Intermediat-Peak detektiert werden konnte. Das Cystein an Position 324 wird anscheinend für eine effiziente Katalyse benötigt, indem es entweder an der Koordinierung des Clusters oder im Elektronentransport der Reaktion beteiligt ist.

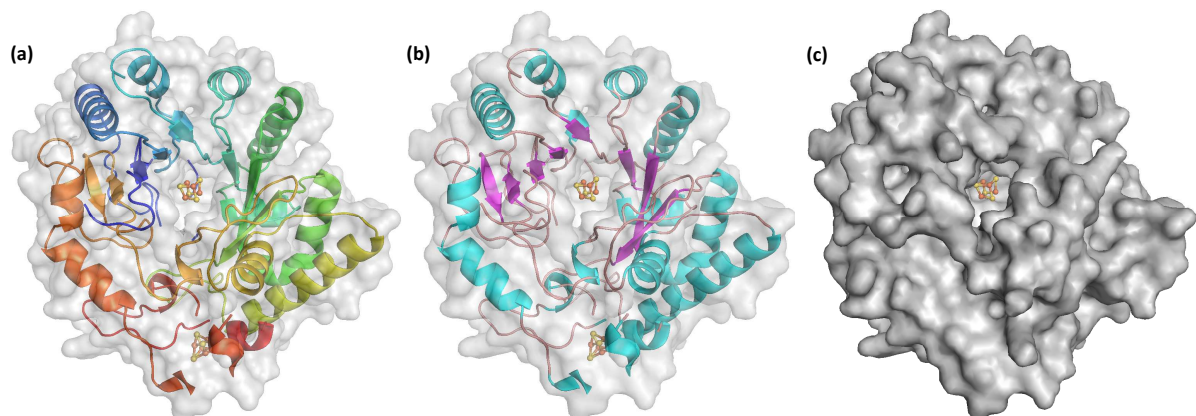


Abbildung 3.48: I-Tasser-Modell von AhbD aus *M. barkeri* modelliert nach RlmN. Wie für RS-Enzyme typisch besitzt auch das modellierte AhbD (hier mit manuell modelliertem C-terminalen Cluster) eine zentrale β -Faltblattstruktur, welche von α -Helices umgeben wird. (a) Regenbogenfarbige Einfärbung sowie (b) entsprechend der verschiedenen Sekundärstrukturen. (türkis): α -Helices; (pink): β -Faltstränge. (c) Oberflächenstruktur des modellierten AhbD. Das N-terminale Cluster scheint frei zugänglich für die Substrate zu sein und deutet somit auf das aktive Zentrum innerhalb der β -Faltstränge hin. (gelb/orange): [4Fe-4S]-Cluster; (grau): Oberfläche des modellierten AhbD.

Der Bereich um das N-terminale Cluster im Modell nach RlmN beinhaltet in der Datenbank bereits ein SAM-Molekül, welches sich in Nähe des RS-Clusters befand. Trotz des bereits gebundenen SAM war der flüssigkeitszugängliche Raum sowohl im Öffnungsbereich als auch vor dem N-terminalen Cluster innerhalb des Proteins groß genug um ein Molekül des Fe-Copro III in die Struktur legen zu können (Abbildung 3.49 (a)). Eine Drehung der y-Achse um 90° zeigte, dass im Modell eine zweite zusätzliche Eintrittsmöglichkeit für das SAM-Molekül bestehen könnte (Abbildung 3.49 (b)). Interessanter Weise stehen RS-Cluster,

SAM und Fe-Copro III in unmittelbarem Kontakt wohingegen das zusätzliche C-terminale Cluster mit einer Distanz von 17,2-25,5 Å zu weit vom N-terminalen Cluster als auch vom Fe-Copro III für eine direkte Interaktion oder einen Elektronentransfer entfernt zu sein scheint (Abbildung 3.49 (c)). Es wäre allerdings durchaus möglich, dass während der Reaktion strukturelle Veränderungen innerhalb des Proteins auftreten und somit die Nähe der einzelnen Komponenten zueinander verändern könnten.

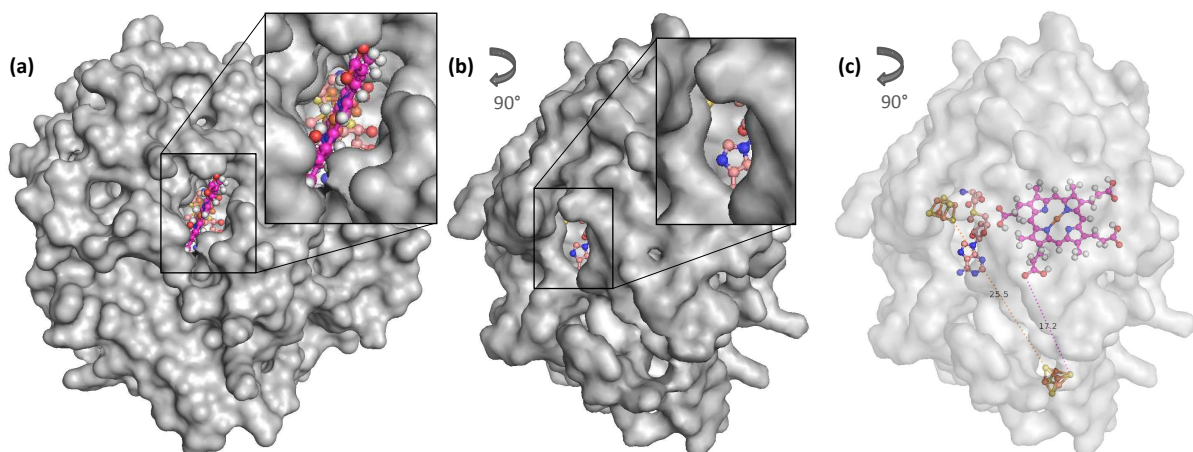


Abbildung 3.49: I-Tasser-Modell von AhbD aus *M. barkeri* modelliert nach RlmN mit SAM und Fe-Copro III im aktiven Zentrum. (a) Die Frontansicht sowie (b) eine um 90° gedrehte Ansicht des modellierten AhbD zeigen, dass nicht nur eine größere Bindetasche für Fe-Copro III, sondern auch eine potentiell zweite separate Eintrittsstelle für das SAM im wt AhbD vorhanden sein könnte. (c) Im Modell liegt das manuell modellierte C-terminale Cluster für eine direkte Interaktion mit Fe-Copro III oder dem N-terminalen Cluster mit 17,2 Å bzw. 25,5 Å zu weit entfernt vor. (gelb): Stickstoff; (rot): Sauerstoff; (blau): Stickstoff; (orange): Eisen; (hautfarben): Kohlenstoffe des durch RlmN modellierten SAM; (pink): Kohlenstoffe des manuell modellierten Fe-Copro III; (grau): Oberfläche des modellierten AhbD durch RlmN.

Durch die simulierte Bindetasche und das manuell inserierte Fe-Copro III konnten die umliegenden AS-Reste des AhbD auf Kandidaten untersucht werden, die potentiell in einer Substratbindung involviert sein könnten. Unter den Fe-Copro III umgebenden AS-Resten konnte kein Histidin ausgemacht werden, welches wie im Fall des NirDL aus *Hydrothermobacter thermophilus* häufig an der Koordinierung des zentralen Eisens von Tetrapyrrolen beteiligt ist (Haufschildt *et al.*, 2014). IsdA aus *Staphylococcus aureus*, welches im Prozess der Eisengewinnung als Häm-Transporter fungiert, bindet Häm über sein chelatiertes Eisenatom durch einen Tyrosin-Rest sowie die Propionatgruppen an Position C13 und C17 durch Lysin, Serin und Histidin (Abbildung 3.50 (a)) (Grigg *et al.*, 2011). Die Lokalisierung ähnlicher AS-Reste in AhbD in der Nähe des Substrats lassen annehmen, dass diese an der Bindung des Fe-Copro III über Wasserstoffbrücken beteiligt sein könnten und stellen somit Kandidaten für zukünftige Bindungstests mit mutagenisierten AhbD-Varianten dar (Abbildung 3.50 (b)).

Wie bei allen Modellen kann allerdings nur eine gelöste Proteinstruktur mit verschiedenen Additiven Aufschluss über die genaue Struktur und Lokalisation der Substrate im aktiven Zentrum liefern.

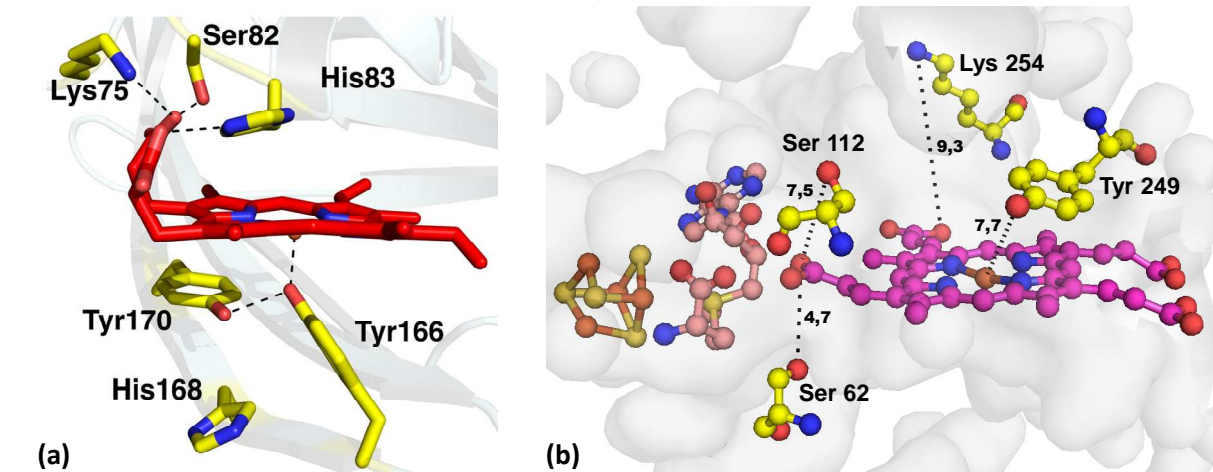


Abbildung 3.50: Vergleich der Substratbindung des IsdA mit dem mit I-Tasser modellierten AhbD nach RlmN. (a) Häm-Bindetasche des IsdA aus *Staphylococcus aureus* (Grigg *et al.*, 2011) sowie (b) die potentielle Fe-Copro III-Bindetasche des I-Tasser-Modells von AhbD aus *M. barkeri* modelliert nach RlmN mit SAM und Fe-Copro III im aktiven Zentrum. (a) An der Bindung von Häm sind in IsdA Lysine, Serine und Histidine involviert. Tyrosin koordiniert hierbei das Häm über sein zentrales Eisenatom. (b) Im modellierten AhbD sind ebenfalls benachbarte Serine, Lysine und Tyrosine vorhanden, die mit dem Fe-Copro III eine potentielle Wechselwirkung eingehen könnten um das Substrat zu binden. (gestrichelte Linien): (potentielle) Wasserstoffbrücken sowie Bindung der Metallliganden mit ggf. Abstand in Ångström. (gelb): Stickstoff; (rot): Sauerstoff; (blau): Stickstoff; (orange): Eisen. Die entsprechenden Kohlenstoffe sind für Häm: rot; Fe-Copro III: pink; SAM: hautfarben; AS-Reste: gelb.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die letzten enzymatischen Schritte des alternativen Häm-Biosynthesewegs in *Archaea* charakterisiert. Durch *in-vivo*-Enzymtests wurden die Proteine AhbA und AhbB aus *Methanosarcina barkeri* (Mbar_A1459 und Mbar_A1460) als Sirohäm-Decarboxylase identifiziert. Weiterhin wurde AhbC (Mbar_A1793) als DDSH-Deacetylase in *M. barkeri* identifiziert, welche 12,18-Didecarboxysirohäm (DDSH) zu Fe-Coproporphyrin III (Fe-Copro III) umsetzt. Rekombinantes AhbA und AhbB aus *M. barkeri* wurden mit gebundenem Hm als heterodimerer Komplex co-gereinigt. Durch einen anaerob durchgeführten *in-vitro*-Enzymtest wurde die Aktivität von AhbAB als SH-Decarboxylase bestätigt und ein direkter negativer Einfluss der Häm-Bindung auf die Enzymaktivität konnte ausgeschlossen werden.

AhbD aus *M. barkeri* (Mbar_A1458) wurde nach rekombinanter Produktion in *E. coli*-Zellen in seiner nativen Form durch die Verwendung von Blue Sepharose sowie einem Anionenaustauscher gereinigt. Bestimmungen des Eisen- sowie Schwefelgehalts des Proteins zeigten, dass es zwei [4Fe-4S]-Cluster koordinierte. Durch einen neu etablierten *in-vitro*-Enzymtest konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei AhbD um die alternative Häm-Synthase handelte, die zur Familie der RS-Enzyme gehört.

Für AhbD sowie für die in dieser Arbeit erzeugten AhbD-Varianten wurde eine aerobe Reinigung mittels eines N-terminal fusionierten His-Tags erfolgreich etabliert, nach der im Anschluss eine chemische Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster erfolgte. Die Bestimmung des Eisen- und Schwefelgehalts sowie ESR-Analysen bestätigten, dass im wt AhbD zwei [4Fe-4S]^{2+/1+}-Cluster vorhanden waren und beide durch Dithionit reduziert werden konnten. In den Varianten AhbD C19A/C23A bzw. AhbD C321A/C324A wurde erfolgreich die N-terminale bzw. die C-terminale Clusterbindung aufgehoben, sodass in den ESR-Spektren beider Cluster-Varianten die Anwesenheit von jeweils einem [4Fe-4S]^{2+/1+}-Cluster nachgewiesen werden konnte. Für beide [4Fe-4S]-Cluster wurden die jeweiligen Redox-Potentiale durch zyklische Voltammetrie bestimmt.

Durch SAM-Spaltungsassays des wt AhbD als auch der AhbD-Varianten wurde das N-terminale Cluster als einziges RS-Cluster innerhalb von AhbD identifiziert. Für die Spaltung von SAM zu Methionin und einem DOA-Radikal war die Anwesenheit des Substrats nötig, wobei auch Substratanaloga mit anderen Metallionen eine Spaltung initiierten. Trotz positiver SAM-Spaltung konnte für AhbD C321A/C324A keine Häm-

Synthase-Aktivität detektiert werden, wodurch gezeigt wurde, dass beide Cluster essentiell für die Aktivität des AhbD sind.

Die Bindung von Fe-Copro III an AhbD sowie der Substratanaloga Copro III, Cu-Copro III sowie Zn-Copro III konnte erfolgreich spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Bindung war unabhängig von der Art des zentralen Metallions des Substrats und unabhängig von der Anwesenheit des C-terminalen Clusters. Eine schwache Umsetzung dieser Substratanaloga konnte über die Bildung eines entsprechenden Monovinyl-Intermediats und Endprodukts nachgewiesen werden, wobei die Umsetzung der Analoga nicht vollständig ablief.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit konnte ein Reaktionsmechanismus postuliert werden, indem das zusätzliche Cluster von AhbD am Elektronentransport vom Substratradikal auf einen externen, terminalen Akzeptor beteiligt ist.

AhbD aus *Metallosphaera sedula* wurde erfolgreich produziert und gereinigt. Erste Kristallisations-Versuche dieses Proteins zeigten das Auftreten hexagonaler kristalliner Strukturen, aus denen jedoch kein Datensatz zur Ermittlung einer Proteinstruktur gewonnen werden konnte.

5 Summary

This work has unraveled the last enzymatic steps of the alternative heme biosynthesis in *Archaea*. Using *in vivo* enzyme assays, the proteins AhbA and AhbB of *Methanosarcina barkeri* (Mbar_A1459 and Mbar_A1460) were identified as siroheme decarboxylase. Also AhbC (Mbar_A1793) could be identified as DDSH deacetylase converting 12,18-didecarboxysiroheme (DDSH) into iron-coproporphyrin III (Fe-Copro III). AhbA and AhbB from *M. barkeri* were purified as heterodimeric complex with bound heme. An anaerobic *in vitro* assay confirmed the role of AhbAB as SH decarboxylase and showed that additional heme has no negative effect of enzyme activity by inhibiting the complex directly.

AhbD from *M. barkeri* (Mbar_A1458) was produced recombinantly and purified in its native form by the usage of a combination of blue sepharose and anion exchange chromatography. Determination of the iron and sulfur content revealed the presence of two [4Fe-4S] clusters within the structure of AhbD. Using a newly established anaerobic *in vitro* enzyme assay, AhbD was confirmed to be the alternative heme synthase belonging to the family of RS enzymes.

An aerobic purification method for AhbD as well as for its variants was established using an N-terminally fused histidine tag followed by chemical reconstitution of the iron sulfur clusters. A determination of the iron and sulfur content as well as EPR analysis confirmed the presence of two coordinated [4Fe-4S]^{2+/1+} clusters within wt AhbD which could be reduced with dithionite. The variants AhbD C19A/C23A and AhbD C321A/C324A showed only one bound [4Fe-4S]^{2+/1+} cluster within their recorded EPR spectra, confirming that the N-terminal or the C-terminal Cluster were either successfully unable to bind. Using cyclic voltametry, the redox potentials of both [4Fe-4S] clusters were determined.

SAM cleavage assays with wt AhbD as well as both variants demonstrated that the N-terminal cluster is the only RS cluster present. For the cleavage of SAM into methionine and a DOA radical, the presence of the substrate was necessary, which could also be replaced by analogs containing other metal ions. Despite AhbD C321A/C324A showing positive results for the SAM cleavage, no enzymatic activity could be detected, indicating that both clusters are essential for the activity of AhbD.

Using UV/vis spectroscopy, binding of Fe-copro III and the analogs copro III, Cu-copro III and Zn-copro III was shown to occur independently from the present central metal ion and both clusters in AhbD. A low conversion of these analogs was verified *via* the detected

formation of the correspondent monovinyl intermediates or products. However the conversion in those events was not complete.

Based on the results of this work a reaction mechanism for AhbD was postulated. The auxiliary cluster of AhbD is thereby involved in electron transfer from the substrate radical onto an external terminal acceptor.

AhbD from *Metallosphaera sedula* was successfully produced and purified. First crystallization attempts of this protein showed the appearance of hexagonal crystal-like structures. Yet no data could be obtained from these grown formations.

6 **Ausblick**

In dieser Arbeit wurden die Enzyme der letzten Syntheseschritte des alternativen Häm-Biosynthesewegs aus *M. barkeri* charakterisiert. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse werfen neue Fragestellungen bezüglich der Regulation dieses Weges sowie der Reaktionsmechanismen der daran beteiligten RS-Enzyme auf.

I. Charakterisierung von AhbAB als Transkriptionsregulations-Komplex:

Nachweis einer *feedback*-Regulation des Syntheseweges durch gebundenes Häm an AhbAB über Inhibierung der Transkription von *ahbC* und/oder *ahbD*:

- Identifizierung einer potentiellen Promotorregion durch DNA-Bindungsstudien mittels Gelretardations-Analysen
- Untersuchungen zur Promotoraktivität *in vivo*

II. Charakterisierung des AhbD:

Aufklärung des vollständigen Reaktionsmechanismus von AhbD und der Rolle des zusätzlichen [4Fe-4S]-Clusters:

- Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen von AhbD mit SAM und Substrat (-Analogon) zur strukturellen Aufklärung
- Bestimmung der zuerst modifizierten Propionatgruppe an Position C3 oder C8
- Identifizierung der Cluster koordinierenden C-terminalen sowie katalytisch involvierten Cysteine durch Charakterisierung von Mehrfach-Cysteinmutanten
- Bestimmung der Substrat bindenden Aminosäuren durch Mutationsanalysen
- Nachweis der während der Reaktion gebildeten Nebenprodukte
- Nachweis des gebildeten Substratradikals sowie der Reduktion des Substrats und der Cluster während der Reaktion durch ESR-Analysen
- Optimierung des *in-vitro*-Enzymtests durch Identifizierung des natürlichen Elektronen-Donors und -Akzeptors in *M. barkeri*
- Untersuchungen zur strukturellen Veränderung bei Substratbindung

III. Entschlüsselung des kompletten alternativen Häm-Biosynthesewegs in *Archaea*:

Identifizierung der Ferrochelatase aus *M. barkeri* und damit des letzten unbekannten Enzyms des alternativen Häm-Biosynthesewegs.

7 Literaturverzeichnis

- AKUTSU, H., PARK, J.-S. & SANO, S. (1993). L-Methionine methyl is specifically incorporated into the C-2 and C-7 positions of the porphyrin of cytochrome c_3 in a strictly anaerobic bacterium, *Desulfovibrio vulgaris*. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 12185-12186.
- AL-KARADAGHI, S., FRANCO, R., HANSSON, M., SHELNUTT, J. A., ISAYA, G. & FERREIRA, G. C. (2006). Chelataases: distort to select? *Trends in biochemical sciences* **31**, 135-42.
- ALIVERTI, A., HAGEN, W. R. & ZANETTI, G. (1995). Direct electrochemistry and EPR spectroscopy of spinach ferredoxin mutants with modified electron transfer properties. *FEBS letters* **368**, 220-4.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-10.
- ARMSTRONG, F. A., HILL, H. A. O. & WALTON, N. J. A. C. R. (1988). Direct electrochemistry of redox proteins. *Acc. Chem. Res.* **21**, 407-413.
- BALI, S., LAWRENCE, A. D., LOBO, S. A., SARAIVA, L. M., GOLDING, B. T., PALMER, D. J., HOWARD, M. J., FERGUSON, S. J. & WARREN, M. J. (2011). Molecular hijacking of siroheme for the synthesis of heme and d1 heme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 18260-5.
- BATTERSBY, A. R., JONES, K., McDONALD, E., ROBINSON, J. A. & MORRIS, H. R. (1977). The structures and chemistry of isobacteriochlorins from *Desulphovibrio gigas*. *Tetrahedron Letters* **25**, 2213-2216.
- BEALE, S. I. & CASTELFRANCO, P. A. (1973). ^{14}C incorporation from exogenous compounds into -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochemical and biophysical research communications* **52**, 143-9.
- BEALE, S. I., GOUGH, S. P. & GRANICK, S. (1975). Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**, 2719-23.
- BEINERT, H. (1983). Semi-micro methods for analysis of labile sulfide and of labile sulfide plus sulfane sulfur in unusually stable iron-sulfur proteins. *Analytical biochemistry* **131**, 373-8.
- BEINERT, H., HOLM, R. H. & MUNCK, E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**, 653-9.

- BERKOVITCH, F., NICOLET, Y., WAN, J. T., JARRETT, J. T. & DRENNAN, C. L. (2004). Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme. *Science* **303**, 76-9.
- BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **62**, 293-300.
- BIANCHI, V., ELIASSON, R., FONTECAVE, M., MULLIEZ, E., HOOVER, D. M., MATTHEWS, R. G. & REICHARD, P. (1993). Flavodoxin is required for the activation of the anaerobic ribonucleotide reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **197**, 792-7.
- BOAL, A. K., GROVE, T. L., MCLAUGHLIN, M. I., YENNAWAR, N. H., BOOKER, S. J. & ROSENZWEIG, A. C. (2011). Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme. *Science* **332**, 1089-92.
- BOOKER, S. J. (2009). Anaerobic functionalization of unactivated C-H bonds. *Current opinion in chemical biology* **13**, 58-73.
- BOYNTON, T. O., GERDES, S., CRAVEN, S. H., NEIDLE, E. L., PHILLIPS, J. D. & DAILEY, H. A. (2011). Discovery of a gene involved in a third bacterial protoporphyrinogen oxidase activity through comparative genomic analysis and functional complementation. *Applied and environmental microbiology* **77**, 4795-801.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- BRINKMAN, A. B., ETTEMA, T. J., DE VOS, W. M. & VAN DER OOST, J. (2003). The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular microbiology* **48**, 287-94.
- BRODERICK, J. B., DUFFUS, B. R., DUSCHENE, K. S. & SHEPARD, E. M. (2014). Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chemical reviews* **114**, 4229-317.
- BUCHENAU, B., KAHNT, J., HEINEMANN, I. U., JAHN, D. & THAUER, R. K. (2006). Heme biosynthesis in *Methanosarcina barkeri* via a pathway involving two methylation reactions. *Journal of bacteriology* **188**, 8666-8.
- BUSCH, J. L., BRETON, J. L., BARTLETT, B. M., ARMSTRONG, F. A., JAMES, R. & THOMSON, A. J. (1997). [3Fe-4S] <--> [4Fe-4S] cluster interconversion in *Desulfovibrio africanus* ferredoxin III: properties of an Asp14 --> Cys mutant. *The Biochemical journal* **323** (Pt 1), 95-102.

- CABISCOL, E., TAMARIT, J. & ROS, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **3**, 3-8.
- CALVO, J. M. & MATTHEWS, R. G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in Escherichia coli. *Microbiological reviews* **58**, 466-90.
- CAVALLARO, G., DECARIA, L. & ROSATO, A. (2008). Genome-based analysis of heme biosynthesis and uptake in prokaryotic systems. *Journal of proteome research* **7**, 4946-54.
- CHANG, C. K., TIMKOVICH, R. & WU, W. (1986). Evidence that heme d1 is a 1,3-porphyrindione. *Biochemistry* **25**, 8447-53.
- CHEN, Y. P. & YOCH, D. C. (1989). Isolation, characterization, and biological activity of ferredoxin-NAD⁺ reductase from the methane oxidizer Methylosinus trichosporium OB3b. *Journal of bacteriology* **171**, 5012-6.
- CHIM, N., INIGUEZ, A., NGUYEN, T. Q. & GOULDING, C. W. (2010). Unusual diheme conformation of the heme-degrading protein from Mycobacterium tuberculosis. *Journal of molecular biology* **395**, 595-608.
- COSPER, M. M., JAMESON, G. N., HERNANDEZ, H. L., KREBS, C., HUYNH, B. H. & JOHNSON, M. K. (2004). Characterization of the cofactor composition of Escherichia coli biotin synthase. *Biochemistry* **43**, 2007-21.
- DAILEY, H. A. (2002). Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochemical Society transactions* **30**, 590-5.
- DE ARMAS-RICARD, M., LEVICAN, G., KATZ, A., MOSER, J., JAHN, D. & ORELLANA, O. (2011). Cellular levels of heme affect the activity of dimeric glutamyl-tRNA reductase. *Biochemical and biophysical research communications* **405**, 134-9.
- DEMIREL, B. & SCHERER, P. (2008). The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* **7**, 173-190.
- DUIN, E. C., LAFFERTY, M. E., CROUSE, B. R., ALLEN, R. M., SANYAL, I., FLINT, D. H. & JOHNSON, M. K. (1997). [2Fe-2S] to [4Fe-4S] cluster conversion in Escherichia coli biotin synthase. *Biochemistry* **36**, 11811-20.
- DUNFORD, H. B. (2002). Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews* **233**, 311-318.

- ETTEMA, T. J., BRINKMAN, A. B., TANI, T. H., RAFFERTY, J. B. & VAN DER OOST, J. (2002). A novel ligand-binding domain involved in regulation of amino acid metabolism in prokaryotes. *The Journal of biological chemistry* **277**, 37464-8.
- FERREIRA, G. C. & ZHANG, J. S. (2002). Mechanism of 5-aminolevulinate synthase and the role of the protein environment in controlling the cofactor chemistry. *Cellular and molecular biology* **48**, 827-33.
- FINN, R. D., BATEMAN, A., CLEMENTS, J., COGGILL, P., EBERHARDT, R. Y., EDDY, S. R., HEGER, A., HETHERINGTON, K., HOLM, L., MISTRY, J., SONNHAMMER, E. L., TATE, J. & PUNTA, M. (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic acids research* **42**, D222-30.
- FISH, W. W. (1988). Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. *Methods in enzymology* **158**, 357-64.
- FLÜHE, L., BURGHHAUS, O., WIECKOWSKI, B. M., GIESSEN, T. W., LINNE, U. & MARAHIEL, M. A. (2013). Two [4Fe-4S] clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyze thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 959-62.
- FLÜHE, L., KNAPPE, T. A., GATTNER, M. J., SCHAFER, A., BURGHHAUS, O., LINNE, U. & MARAHIEL, M. A. (2012). The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nature chemical biology* **8**, 350-7.
- FONTECAVE, M. & OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, S. (2008). Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *Archives of biochemistry and biophysics* **474**, 226-37.
- FRANKENBERG, N., MOSER, J. & JAHN, D. (2003). Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Applied microbiology and biotechnology* **63**, 115-27.
- FREY, P. A., HEGEMAN, A. D. & RUZICKA, F. J. (2008). The Radical SAM Superfamily. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **43**, 63-88.
- GOLDMAN, P. J., GROVE, T. L., SITES, L. A., McLAUGHLIN, M. I., BOOKER, S. J. & DRENNAN, C. L. (2013). X-ray structure of an AdoMet radical activase reveals an anaerobic solution for formylglycine posttranslational modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 8519-24.
- GRANT, S. G., JESSEE, J., BLOOM, F. R. & HANAHAN, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into Escherichia coli methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4645-9.

- GRIGG, J. C., MAO, C. X. & MURPHY, M. E. (2011). Iron-coordinating tyrosine is a key determinant of NEAT domain heme transfer. *Journal of molecular biology* **413**, 684-98.
- GRIMM, F., CORT, J. R. & DAHL, C. (2010). DsrR, a novel IscA-like protein lacking iron- and Fe-S-binding functions, involved in the regulation of sulfur oxidation in *Allochromatium vinosum*. *Journal of bacteriology* **192**, 1652-61.
- HAFT, D. H. & BASU, M. K. (2011). Biological systems discovery in silico: radical S-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification. *Journal of bacteriology* **193**, 2745-55.
- HÄNZELMANN, P., HERNANDEZ, H. L., MENZEL, C., GARCIA-SERRES, R., HUYNH, B. H., JOHNSON, M. K., MENDEL, R. R. & SCHINDELIN, H. (2004). Characterization of MOCS1A, an oxygen-sensitive iron-sulfur protein involved in human molybdenum cofactor biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **279**, 34721-32.
- HÄNZELMANN, P. & SCHINDELIN, H. (2006). Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 6829-34.
- HAUFSCHILDT, K., SCHMELZ, S., KRIEGLER, T. M., NEUMANN, A., STREIF, J., ARAI, H., HEINZ, D. W. & LAYER, G. (2014). The crystal structure of siroheme decarboxylase in complex with iron-uroporphyrin III reveals two essential histidine residues. *Journal of molecular biology*.
- HEINEMANN, I. U., JAHN, M. & JAHN, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of biochemistry and biophysics* **474**, 238-51.
- HERNÁNDEZ, H. L., PIERREL, F., ELLEINGAND, E., GARCIA-SERRES, R., HUYNH, B. H., JOHNSON, M. K., FONTECAVE, M. & ATTA, M. (2007). MiaB, a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in the thiolation and methylation of tRNA, contains two essential [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* **46**, 5140-7.
- ISHIDA, T., YU, L., AKUTSU, H., OZAWA, K., KAWANISHI, S., SETO, A., INUBUSHI, T. & SANO, S. (1998). A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4853-8.
- JAHN, D., VERKAMP, E. & SÖLL, D. (1992). Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends in biochemical sciences* **17**, 215-8.

- JONES, A. M. & ELLIOTT, T. (2010). A purified mutant HemA protein from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacks bound heme and is defective for heme-mediated regulation in vivo. *FEMS microbiology letters* **307**, 41-7.
- JORDAN, P. M. (1994). Highlights in haem biosynthesis. *Current opinion in structural biology* **4**, 902-11.
- KAKUTANI, T. & SENDA, M. (1973). Determination of Electrochemical Kinetic Parameters of Porphyrins and Metalloporphyrins in *N,N'*-Dimethylformamide by Radio Frequency Polarographic Method. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **46**, 3720-3723.
- KAKUTANI, T., TOTSUKA, S. & SENDA, M. (1973). Polarographic Studies of Some Porphyrins and Metalloporphyrins in *N, N*-Dimethylformamide. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **46**, 3652-3657.
- KANNANGARA, C. G., GOUGH, S. P., BRUYANT, P., HOOBER, J. K., KAHN, A. & VON WETTSTEIN, D. (1988). tRNA(Glu) as a cofactor in delta-aminolevulinate biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends in biochemical sciences* **13**, 139-43.
- KÖLLING, R. & LOTHER, H. (1985). AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **164**, 310-5.
- KÜHNER, M., HAUFSCILD, K., NEUMANN, A., STORBECK, S., STREIF, J. & LAYER, G. (2014). The Alternative Route to Heme in the Methanogenic Archaeon *Methanosarcina barkeri*. *Archaea* **2014**, 327637.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- LAMOLA, A. A. & YAMANE, T. (1974). Zinc protoporphyrin in the erythrocytes of patients with lead intoxication and iron deficiency anemia. *Science* **186**, 936-8.
- LANZ, N. D. & BOOKER, S. J. (2012). Identification and function of auxiliary iron-sulfur clusters in radical SAM enzymes. *Biochimica et biophysica acta* **1824**, 1196-212.
- LAYER, G., HEINZ, D. W., JAHN, D. & SCHUBERT, W. D. (2004). Structure and function of radical SAM enzymes. *Current opinion in chemical biology* **8**, 468-76.
- LAYER, G., JAHN, D. & JAHN, M. (2011). Heme Biosynthesis. In *Handbook of Porphyrin Science: Biochemistry of Tetrapyrroles*, vol. 15 (ed. K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Giulard).
- LAYER, G., KERVIO, E., MORLOCK, G., HEINZ, D. W., JAHN, D., RETEY, J. & SCHUBERT, W. D. (2005). Structural and functional comparison of HemN to other radical SAM enzymes. *Biological chemistry* **386**, 971-80.

- LAYER, G., REICHEL, J., JAHN, D. & HEINZ, D. W. (2010). Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein science : a publication of the Protein Society* **19**, 1137-61.
- LAYER, G., VERFURTH, K., MAHLITZ, E. & JAHN, D. (2002). Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from Escherichia coli. *The Journal of biological chemistry* **277**, 34136-42.
- LIU, Y., BEER, L. L. & WHITMAN, W. B. (2012). Sulfur metabolism in archaea reveals novel processes. *Environmental microbiology* **14**, 2632-44.
- LIU, Y., SIEPRAWKA-LUPA, M., WHITMAN, W. B. & WHITE, R. H. (2010). Cysteine is not the sulfur source for iron-sulfur cluster and methionine biosynthesis in the methanogenic archaeon Methanococcus maripaludis. *The Journal of biological chemistry* **285**, 31923-9.
- LOBO, S. A., BRINDLEY, A., WARREN, M. J. & SARAIVA, L. M. (2009). Functional characterization of the early steps of tetrapyrrole biosynthesis and modification in Desulfovibrio vulgaris Hildenborough. *The Biochemical journal* **420**, 317-25.
- LOBO, S. A., LAWRENCE, A. D., ROMAO, C. V., WARREN, M. J., TEIXEIRA, M. & SARAIVA, L. M. (2014). Characterisation of Desulfovibrio vulgaris haem b synthase, a radical SAM family member. *Biochimica et biophysica acta* **1844**, 1238-47.
- MAINES, M. D. & KAPPAS, A. (1977). Metals as regulators of heme metabolism. *Science* **198**, 1215-21.
- MERRITT, J. E. & LOENING, K. L. (1980). IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN). Nomenclature of tetrapyrroles. Recommendations 1978. *European journal of biochemistry / FEBS* **108**, 1-30.
- MULLIEZ, E., PADOVANI, D., ATTA, M., ALCOUFFE, C. & FONTECAVE, M. (2001). Activation of class III ribonucleotide reductase by flavodoxin: a protein radical-driven electron transfer to the iron-sulfur center. *Biochemistry* **40**, 3730-6.
- MURPHY, M. J. & SIEGEL, L. M. (1973). Siroheme and sirohydrochlorin. The basis for a new type of porphyrin-related prosthetic group common to both assimilatory and dissimilatory sulfite reductases. *The Journal of biological chemistry* **248**, 6911-9.
- NICOLET, Y., RUBACH, J. K., POSEWITZ, M. C., AMARA, P., MATHEVON, C., ATTA, M., FONTECAVE, M. & FONTECILLA-CAMPS, J. C. (2008). X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from Thermotoga maritima. *The Journal of biological chemistry* **283**, 18861-72.

- OLLAGNIER-DE CHOUDENS, S., SANAKIS, Y., HEWITSON, K. S., ROACH, P., MUNCK, E. & FONTECAVE, M. (2002). Reductive cleavage of S-adenosylmethionine by biotin synthase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **277**, 13449-54.
- OLLAGNIER, S., MULLIEZ, E., SCHMIDT, P. P., ELIASSON, R., GAILLARD, J., DERONZIER, C., BERGMAN, T., GRASLUND, A., REICHARD, P. & FONTECAVE, M. (1997). Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction. *The Journal of biological chemistry* **272**, 24216-23.
- PALMER, D. J., SCHROEDER, S., LAWRENCE, A. D., DEERY, E., LOBO, S. A., SARAIVA, L. M., MCLEAN, K. J., MUNRO, A. W., FERGUSON, S. J., PICKERSGILL, R. W., BROWN, D. G. & WARREN, M. J. (2014). The structure, function and properties of sirohaem decarboxylase - an enzyme with structural homology to a transcription factor family that is part of the alternative haem biosynthesis pathway. *Molecular microbiology* **93**, 247-61.
- PANEK, H. & O'BRIAN, M. R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology* **148**, 2273-82.
- PAPADOPOULOS, J. S. & AGARWALA, R. (2007). COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* **23**, 1073-9.
- PATO, C., CELIER, C., REZAEI, H., GROSCLAUDE, J. & MARDEN, M. C. (2004). Heme as an optical probe of a conformational transition of ovine recPrP. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 1100-7.
- PIERREL, F., BJORK, G. R., FONTECAVE, M. & ATTA, M. (2002). Enzymatic modification of tRNAs: MiaB is an iron-sulfur protein. *The Journal of biological chemistry* **277**, 13367-70.
- QI, Z., HAMZA, I. & O'BRIAN, M. R. (1999). Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13056-61.
- RAMAN, N., MUTHURAJ, V., RAVICHANDRAN, S. & KULANDAISAMY, A. (2003). Synthesis, characterisation and electrochemical behaviour of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes derived from acetylacetone and p-anisidine and their antimicrobial activity. *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **115**, 161-167.

- RINALDO, S., ARCOVITO, A., GIARDINA, G., CASTIGLIONE, N., BRUNORI, M. & CUTRUZZOLA, F. (2008a). New insights into the activity of *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase. *Biochemical Society transactions* **36**, 1155-9.
- RINALDO, S., BRUNORI, M. & CUTRUZZOLA, F. (2008b). Ancient hemes for ancient catalysts. *Plant signaling & behavior* **3**, 135-6.
- ROACH, P. L. (2011). Radicals from S-adenosylmethionine and their application to biosynthesis. *Current opinion in chemical biology* **15**, 267-75.
- ROMÃO, C. V., LOURO, R., TIMKOVICH, R., LUBBEN, M., LIU, M. Y., LEGALL, J., XAVIER, A. V. & TEIXEIRA, M. (2000). Iron-coproporphyrin III is a natural cofactor in bacterioferritin from the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *FEBS letters* **480**, 213-6.
- ROY, A., KUCUKURAL, A. & ZHANG, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* **5**, 725-38.
- SĂSĂRMAN, A., LETOWSKI, J., CZAİKA, G., RAMIREZ, V., NEAD, M. A., JACOBS, J. M. & MORAIS, R. (1993). Nucleotide sequence of the hemG gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12. *Canadian journal of microbiology* **39**, 1155-61.
- SASSA, S. (2004). Why heme needs to be degraded to iron, biliverdin IX α , and Carbon Monoxide? *Antioxidants & Redox Signalling* **6**, 819-824.
- SCHNELL, R., SANDALOVA, T., HELLMAN, U., LINDQVIST, Y. & SCHNEIDER, G. (2005). Siroheme- and [Fe₄-S₄]-dependent NirA from *Mycobacterium tuberculosis* is a sulfite reductase with a covalent Cys-Tyr bond in the active site. *The Journal of biological chemistry* **280**, 27319-28.
- SHEMIN, D. & KUMIN, S. (1952). The mechanism of porphyrin formation; the formation of a succinyl intermediate from succinate. *The Journal of biological chemistry* **198**, 827-37.
- SHEMIN, D. & RITTENBERG, D. (1945). The utilization of glycine for the synthesis of a porphyrin. *J. Biol. Chem.* **159**, 567-568.
- SHEMIN, D. & RITTENBERG, D. (1946). The biological utilization of glycine for the synthesis of the protoporphyrin of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **166**, 621-625.
- SILVESTRINI, M. C., FALCINELLI, S., CIABATTI, I., CUTRUZZOLA, F. & BRUNORI, M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa* nitrite reductase (or cytochrome oxidase): an overview. *Biochimie* **76**, 641-54.

- SOFIA, H. J., CHEN, G., HETZLER, B. G., REYES-SPINDOLA, J. F. & MILLER, N. E. (2001). Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic acids research* **29**, 1097-106.
- SRIVASTAVA, A. & BEALE, S. I. (2005). Glutamyl-tRNA reductase of *Chlorobium vibrioforme* is a dissociable homodimer that contains one tightly bound heme per subunit. *Journal of bacteriology* **187**, 4444-50.
- STORBECK, S., ROLFES, S., RAUX-DEERY, E., WARREN, M. J., JAHN, D. & LAYER, G. (2010). A novel pathway for the biosynthesis of heme in Archaea: genome-based bioinformatic predictions and experimental evidence. *Archaea* **2010**, 175050.
- STUDIER, F. W. & MOFFATT, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-30.
- SUHARTI, S., MURAKAMI, K. S., DE VRIES, S. & FERRY, J. G. (2008). Structural and biochemical characterization of flavoredoxin from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Biochemistry* **47**, 11528-35.
- SUN, J., HOSHINO, H., TAKAKU, K., NAKAJIMA, O., MUTO, A., SUZUKI, H., TASHIRO, S., TAKAHASHI, S., SHIBAHARA, S., ALAM, J., TAKETO, M. M., YAMAMOTO, M. & IGARASHI, K. (2002). Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *The EMBO journal* **21**, 5216-24.
- TAKAHASHI, Y. & TOKUMOTO, U. (2002). A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *The Journal of biological chemistry* **277**, 28380-3.
- THAUER, R. K. & BONACKER, L. G. (1994). Biosynthesis of coenzyme F430, a nickel porphinoid involved in methanogenesis. *Ciba Foundation symposium* **180**, 210-22; discussion 222-7.
- THAW, P., SEDELNIKOVA, S. E., MURANOVA, T., WIESE, S., AYORA, S., ALONSO, J. C., BRINKMAN, A. B., AKERBOOM, J., VAN DER OOST, J. & RAFFERTY, J. B. (2006). Structural insight into gene transcriptional regulation and effector binding by the Lrp/AsnC family. *Nucleic acids research* **34**, 1439-49.
- TIAN, T., HE, H. & LIU, X. Q. (2014). The SufBCD protein complex is the scaffold for iron-sulfur cluster assembly in *Thermus thermophilus* HB8. *Biochemical and biophysical research communications* **443**, 376-81.
- TIPPING, E., KETTERER, B. & KOSKELO, P. (1978). The binding of porphyrins by ligandin. *The Biochemical journal* **169**, 509-16.

- UCHIYAMA, I. (2003). MBGD: microbial genome database for comparative analysis. *Nucleic acids research* **31**, 58-62.
- UCHIYAMA, I. (2007). MBGD: a platform for microbial comparative genomics based on the automated construction of orthologous groups. *Nucleic acids research* **35**, D343-6.
- UCHIYAMA, I., HIGUCHI, T. & KAWAI, M. (2010). MBGD update 2010: toward a comprehensive resource for exploring microbial genome diversity. *Nucleic acids research* **38**, D361-5.
- UCHIYAMA, I., MIHARA, M., NISHIDE, H. & CHIBA, H. (2013). MBGD update 2013: the microbial genome database for exploring the diversity of microbial world. *Nucleic acids research* **41**, D631-5.
- UGULAVA, N. B., FREDERICK, K. K. & JARRETT, J. T. (2003). Control of adenosylmethionine-dependent radical generation in biotin synthase: a kinetic and thermodynamic analysis of substrate binding to active and inactive forms of BioB. *Biochemistry* **42**, 2708-19.
- UGULAVA, N. B., GIBNEY, B. R. & JARRETT, J. T. (2000). Iron-sulfur cluster interconversions in biotin synthase: dissociation and reassociation of iron during conversion of [2Fe-2S] to [4Fe-4S] clusters. *Biochemistry* **39**, 5206-14.
- WALSBY, C. J., HONG, W., BRODERICK, W. E., CHEEK, J., ORTILLO, D., BRODERICK, J. B. & HOFFMAN, B. M. (2002). Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S](+) cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 3143-51.
- WAN, J. T. & JARRETT, J. T. (2002). Electron acceptor specificity of ferredoxin (flavodoxin):NADP⁺ oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Archives of biochemistry and biophysics* **406**, 116-26.
- WANG, L., ELLIOTT, M. & ELLIOTT, T. (1999). Conditional stability of the HemA protein (glutamyl-tRNA reductase) regulates heme biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* **181**, 1211-9.
- WANG, S. C. & FREY, P. A. (2007). Binding energy in the one-electron reductive cleavage of S-adenosylmethionine in lysine 2,3-aminomutase, a radical SAM enzyme. *Biochemistry* **46**, 12889-95.
- XIONG, J., BAUER, C. E. & PANCHOLY, A. (2007). Insight into the haem d1 biosynthesis pathway in heliobacteria through bioinformatics analysis. *Microbiology* **153**, 3548-62.

- YOSHINO, K., MUNAKATA, H., KUGE, O., ITO, A. & OGISHIMA, T. (2007). Haeme-regulated degradation of delta-aminolevulinate synthase 1 in rat liver mitochondria. *Journal of biochemistry* **142**, 453-8.
- ZHANG, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* **9**, 40.
- ZHENG, J., SHAN, Y., LAMBRECHT, R. W., DONOHUE, S. E. & BONKOVSKY, H. L. (2008a). Differential regulation of human ALAS1 mRNA and protein levels by heme and cobalt protoporphyrin. *Molecular and cellular biochemistry* **319**, 153-61.
- ZHENG, W., SHAN, N., YU, L. & WANG, X. (2008b). UV-visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. *Dyes and Pigments* **77**, 153-157.

Anhang

A. Gen- und Proteinsequenzen von *ahbD*/AhbD und AhbD-Varianten

Wt AhbD (*ahbD*/AhbD aus *M. barkeri*, codonoptimiert für *E. coli*)

```

1 ATGATTGCCATGACCAATGCACCGCGTCTGATTGCATGGGAACTGACCGCAGGTTGTAAT 60
  M I A M T N A P R L I A W E L T A G C N
61 CTGAATTGTGTTTCATTGTCGTGGTGCAAGCACCAGCAGCGTTCCGGCAGGCGAACTGACC 120
  L N C V H C R G A S T S S V P A G E L T
121 ACCGATGAAGCAAAACATTTTATTGATGAAGTGGCCAGCATTTGGTAAACCGATTCTGATT 180
  T D E A K H F I D E V A S I G K P I L I
181 CTGAGCGGTGGTGAACCGCTGACCCGTCCGGATGTTTTTTGAAATTGCACGTTATGGCACC 240
  L S G G G E P L T R P D V F E I A R Y G T
241 GATGCAGGTCTGCGTGTGTTCTGGCAACCAATGGCACCCCTGCTGACACCGGAAATTGTT 300
  D A G L R V V L A T N G T L L T P E I V
301 GAAAAAAGTGCCTGCAGCCGGTGTTCAGCGTCTGAGCGTTAGCATTGATGGTGCAAATGCA 360
  E K L R A A G V Q R L S V S I D G A N A
361 GAAACCCATGATAATTTTCGTGGTATGCCTGGTGCATTTGAACGTACCCTGGCAGGTATT 420
  E T H D N F R G M P G A F E R T L A G I
421 GAAGTTCTGCGTAAAGCAGATTTTCCGTTTCAGATTAATACCACCGTGAGCAAACGCAAT 480
  E V L R K A D F P F Q I N T T V S K R N
481 CTGGAAGAAATTACCAAAACCTTTGAACTGGCCAAAGAACTGGGTGCAGTTGCATATCAT 540
  L E E I T K T F E L A K E L G A V A Y H
541 GTGTTTTTTCTGGTTCCGACAGGTCGTGGTGTATGAAAGTGTATGAAGTTAGTCCGGCAGAT 600
  V F F L V P T G R G D E S D E V S P A D
601 TATGAACGTATTCTGCACTGGTTTTATGAAATGCAGAAAGAGAGCAAATTCAGCTGAAA 660
  Y E R I L H W F Y E M Q K E S K I Q L K
661 GCAACCTGTGCACCGCATTATTTTCGTATTATGCGTCAGCAGGCCAAAAAGAAGGCATT 720
  A T C A P H Y F R I M R Q Q A K K E G I
721 GAAATTTCCGTGAAAACCCATGGTTATGAAGCAATGACCAAAGGTTGTCTGGGTGGCACC 780
  E I S V K T H G Y E A M T K G C L G G T
781 GGTTTTTTGTTTTGTTAGCAGCGTTGGTAAAGTTTTTCCGTGTGGTTATCTGCCGTTCTG 840
  G F C F V S S V G K V F P C G Y L P V L
841 GCAGGTAATATTCGTGAACAGCCGTTTTCGTGAAATTTGGGAAAATGCAGAAGTGTTCGT 900
  A G N I R E Q P F R E I W E N A E V F R
901 AAAGTGCATCCGGAAGAACTGAAAGGTAATTGTGGCATCTGCCGAGTATAAAAAAGTT 960
  K L R D P E E L K G K C G I C E Y K K V
961 TGTGCAGGTTGTCGTGCACGTGCATATGCAGCAACCGGTGATTATCTGGAAGAAGAACCG 1020
  C A G C R A R A Y A A T G D Y L E E E P
1021 TATTGTATTTACCGTCCGGGTAAAAAATAA 1050
  Y C I Y R P G K K *
```

AhbD C19A/C23A (modifizierte Sequenz des wt AhbD aus *M. barkeri*)

```

1 MIAMTNAPRL IAWELTAGAN LNAVHCRGAS TSSVPAGELT TDEAKHFIDE VASIGKPILI 60
61 LSGGEPLTRP DVFEIARYGT DAGLRVVLAT NGTLLTPEIV EKLRAAGVQR LSVSIDGANA 120
121 ETHDNFRGMP GAFERTLAGI EVLRKADFPF QINTTVSKRN LEEITKTFFEL AKELGAVAYH 180
181 VFFLVPTGRG DESDEVSPAD YERILHWFYE MQKESKIQLK ATCAPHYFRI MRQQAKKEGI 240
241 EISVKTHGYE AMTKGCLGGT GFCFVSSVGK VFPCGYLPVL AGNIREQPFR EIWENAEVFR 300
301 KLRDPEELKG KCGICEYKKV CAGCRARAYA ATGDYLEEEP YCIYRPGKK 349
```

AhbD C321A/C324A (modifizierte Sequenz des wt AhbD aus *M. barkeri*)

1 MIAMTNAPRL IAWELTAGCN LNCVHCRGAS TSSVPAGELT TDEAKHFIDE VASIGKPILI 60
61 LSGGEPLTRP DVFEIARYGT DAGLRVVLAT NGTLLTPEIV EKLRAAGVQR LSVSIDGANA 120
121 ETHDNFRGMP GAFERTLAGI EVLRKADFPF QINTTVSKRN LEEITKTFEL AKELGAVAYH 180
181 VFFLVPTGRG DESDEVSPAD YERILHWFYE MQKESKIQLK ATCAPHYFRI MRQQAKKEGI 240
241 EISVKTHGYE AMTKGCLGGT GFCFVSSVGK VFPCGYLPVL AGNIREQPFR EIWENAEVFR 300
301 KLRDPEELKG KCGICEYKKV AAGARARAYA ATGDYLEEEP YCIYRPGKK 349

C: potentiell involvierte Cysteine in der Eisen-Schwefel-Cluster Koordinierung

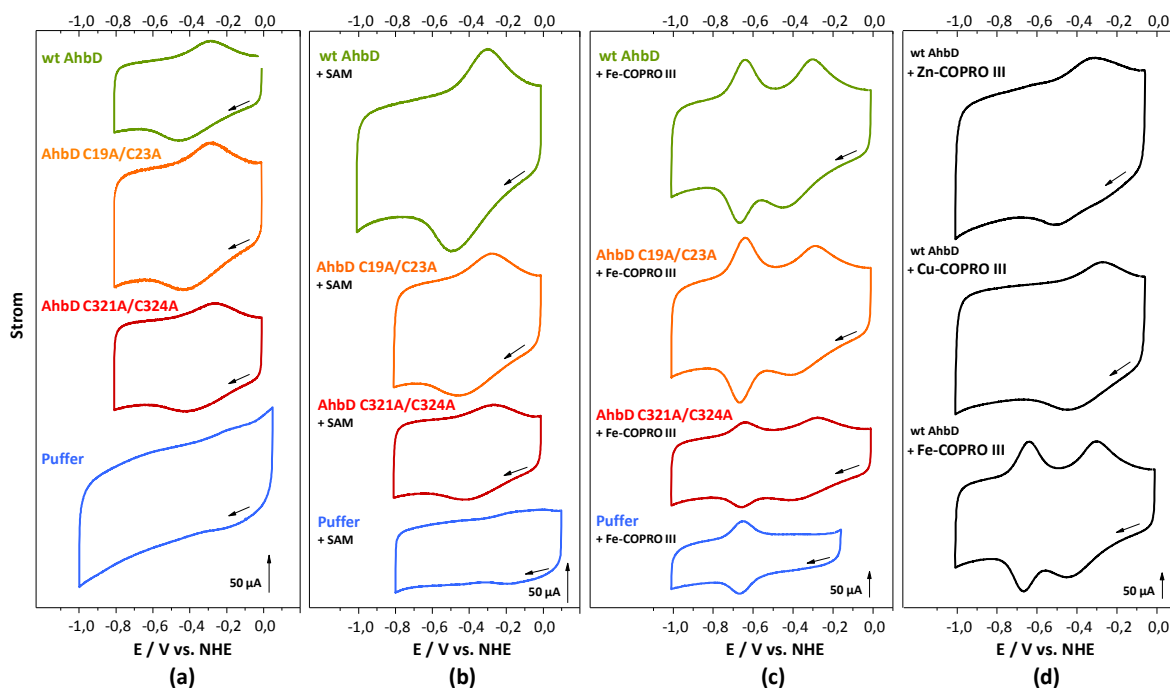
A: eingefügte Alanine im Tausch gegen Cysteine im Vergleich zum wt Protein

B. Aminosäuresequenzen untersuchter Proteine

Organismus	Protein	Gen-Nr. mbgd-Datenbank	NCBI- Referenzsequenz
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	HemN	<i>B3867</i>	NP_418303.2
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	MoaA	<i>B0781</i>	CAA49861.1
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC13124	anSMEcpe	-	ABG83662.1
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro*	Ahb-NirD/AhbA	<i>Mbar_A1459</i>	YP_304996.1
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro*	Ahb-NirH/AhbB	<i>Mbar_A1460</i>	YP_304997.1
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro*	Ahb-NirJ2/AhbC	<i>Mbar_A1793</i>	YP_305314.1
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro*	Ahb-NirJ1/AhbD	<i>Mbar_A1458</i>	YP_304995.1
<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348	Ahb-NirJ1/AhbD	<i>Msed_0512</i>	YP_001190611.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NirD	<i>PA0515</i>	NP_249206.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NirL	<i>PA0514</i>	NP_249205.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NirG	<i>PA0513</i>	NP_249204.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NirH	<i>PA0512</i>	NP_249203.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	NirJ	<i>PA0511</i>	NP_249202.1
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	AhbC	<i>DVU0857</i>	YP_010078.1
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough	AhbD	<i>DVU0855</i>	YP_010076.1

*DSM 804

C. Zyklische Voltammogramme



Anhang, Abbildung I: Zyklische Voltammogramme zur Ermittlung der Halbstufenpotentiale der $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ -Cluster von wt AhbD und AhbD-Varianten. Es ist jeweils der letzte Zyklus der Messungsreihe der entsprechenden Proteinlösung (a) ohne, (b) mit den Additiven SAM oder (c) Fe-Copro III in AhbD-Puffer dargestellt. (d) Die Substratanaloga Zn-Copro III und Cu-Copro III sind redox-inert im gemessenen Bereich. Elektroden: Ag/AgCl (3 mol/L KCl), Pt- und Kohlenstoff. Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte durch Peter Schweyen.

Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei allen bedanken, die auf ihre entsprechende Weise in den letzten drei Jahren eine wichtige Rolle zur Fertigstellung dieser Arbeit eingenommen haben.

Hierzu möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Gunhild „Guni“ Layer für das Veröffentlichen der damals freien Doktorandenstelle bei jobvector und die Entscheidung für mich als neues Mitglied der AG Layer bedanken, wodurch ich die Möglichkeit hatte an einem für mich sehr interessanten Thema zu arbeiten. Vielen Dank für die motivierende Betreuung sowie die Möglichkeit an verschiedenen nationalen sowie internationalen Konferenzen zum Themengebiet teilnehmen zu dürfen. Weiterhin viel Erfolg an der Universität in Leipzig!

Prof. Dr. Dieter Jahn, dem Herrn der (Tetrapyrrol-) Ringe, gilt ebenfalls ein großes Dankeschön für neue Ideen und Diskussionen während der Institutsseminare sowie der zweiten Begutachtung dieser Dissertation.

Meinem Dank gilt auch Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission sowie seiner aufgebauten Forschungsgruppe PROTRAIN, die auch an der Finanzierung meiner Forschungen nicht ganz unbeteiligt war.

Bei den frühen Mitgliedern der AG Layer, darunter Tristan Nicke, Tobias „Der Pope“ Schnitzer, Judith „Killer-Miller“ Streif sowie „Scarlett“, „Ryan“ und „James“, möchte ich mich für die nette Aufnahme in ihr Laborrevier bedanken. Den neu dazugewonnenen Kollegen Kristin Haufschildt, Katja Böhme, Julia Adamczack und Linda Boss möchte ich ebenso wie der gesamten Arbeitsgruppe für die gemeinsamen Stunden auf Konferenzen, beim „Käffchen“ oder im Labor, vor allem mit den täglichen speziellen „verrückten 5-10 min“, danken. „Ich wünsche euch ein schönes Wochenende. Das schönste Wochenende der Welt!“ Auch ein Dankeschön gebührt meinen Studenten Mandy Messal, Lucile Wendt sowie Nils Birkholz für ihre ausgezeichnete Arbeit mit den verschiedenen AhbD-Proteinen.

An dieser Stelle möchte ich auch den Kooperationspartnern Dr. Edward J. Reijerse vom MPI in Mülheim an der Ruhr, Prof. Dr. Martin Bröring, Peter Schweyen, Martin Hoffmann und Alexander Neumann von der TU Braunschweig sowie Dr. Jörn Krauß und Beate Jaschock-

Kentner vom HZI in Braunschweig für Synthesen, Messzell-Innovationen und natürlich den Messungen sowie deren Auswertungen danken.

Natürlich sein das gesamte restliche Institut für Mikrobiologie nicht vergessen, dem Dank für das tolle Arbeitsklima gebührt, das ich während der letzten Jahre erleben durfte. Der Arbeitsgruppe von Dr. Jürgen „Johnny“ Moser danke ich hierbei besonders für die gemeinsamen Freitags-Seminare, ob mit oder ohne Einstands-, Ausstands- oder Bergfest-Kuchen. Einen nicht zu unterschätzenden Einfluss hatten auch die freundlichen Mitarbeiter der Audimax-Cafeteria sowie das technische Personal bestehend aus Dagmar Rose und Barbara Cwiklinski. Des Weiteren möchte ich Bernd „BH“ Hoppe, Christina Nitzsche und Daniela Schnobel für Rat und Tat sowie der bewundernswerten Organisation der Geldmittel danken als auch dem kleinen Studium der Reisekostenabrechnungen.

Auch anderen Doktoranden verschiedener Arbeitsgruppen gebührt an dieser Stelle besonderer Dank. Danke an die damaligen Mit-Doktoranden Sebastian „Seeb“ Laaß, Melanie Burghartz, Tobias „KT“ Knuuti, Dagmar Zwerschke, Vera Haskamp, Jenny „JJ“ Jacobs, Constanze „Conny“ Finger, Christiane Lange und Svenja Kiesel sowie der für immer „das Bätschi“ bleibende Mareike Berges für Motivation, Inspiration, Zusammenarbeit, Doktorandentreffen im Eusebia, diverse organisierte Motto-Partys, „indische Geschäftsessen“ und für meine Aufnahme in das mir damals fremde Braunschweig inklusive Zweit- und Erstliga-Fußballspielkultur in der Geburtsstätte des deutschen Fußballs. DANKE!

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken, die wie auch zu den Zeiten meiner Diplomarbeit weder am praktischen noch theoretischen Teil meiner Arbeit mitwirkten, mich jedoch unter anderem durch ihre damalige finanzielle Unterstützung auf dem Weg zum Studienabschluss begleitet haben, wodurch ich erst diese Doktorandenstelle antreten konnte. Dieses Mal brauchte ich keine derartige finanzielle Hilfe, jedoch möchte ich ihnen sowie meiner Schwester und Oma für die vielen Telefonate und die gemeinsame Zeit hier in Braunschweig und in der Heimat danken. Besonders hervorheben möchte ich hierbei meine Oma für ihre ehrlichen Ratschläge sowie inspirierende und aufbauende Gespräche, der es sicherlich schwer gefallen sein dürfte mir das weit entfernte Braunschweig ans Herz zu legen. DANKE EUCH ALLEN!